

IMOBILIZAÇÃO DE FIBRONECTINA NA SUPERFÍCIE DE SUPORTES POROSOS  
DE PHB PARA APLICAÇÃO EM ENGENHARIA ÓSSEA

Roberta Helena Mendonça

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DA COORDENAÇÃO DOS  
PROGRAMAS DE PÓS-GRADUAÇÃO DE ENGENHARIA DA UNIVERSIDADE  
FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS  
PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS EM ENGENHARIA  
METALÚRGICA E DE MATERIAIS.

Aprovada por:

---

Prof. Rossana Mara da Silva Moreira Thiré, D.Sc.

---

Prof Marysilvia Ferreira da Costa, D.Sc.

---

Prof. Glória Dulce de Almeida Soares, D.Sc.

---

Prof. Fernando Costa e Silva Filho, D.Sc.

RIO DE JANEIRO, RJ – BRASIL

FEVEREIRO DE 2008

MENDONÇA, ROBERTA HELENA

Imobilização de Fibronectina na Superfície de Suportes Porosos de PHB para Aplicação em Engenharia Óssea. [Rio de Janeiro] 2008.

XIX, 119. 29,7 cm (COPPE/UFRJ, M.Sc., Engenharia Metalúrgica e de Materiais, 2008)

Dissertação - Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE.

1. Polihidroxibutirato
2. Fibronectina
3. . Suportes Porosos
4. . Modificação de superfície

I. COPPE/UFRJ

II. Título (série)

“Chuang Tzu e Hui Tzu

Atravessavam o rio Hao

Pelo açude.

Disse Chuang:

‘Veja como os peixes

pulam e correm tão livremente

Isto é sua felicidade’

Respondeu Hui:

‘Desde que você não é um peixe

Como sabe

O que torna os peixes felizes?’

Chuang respondeu:

‘Desde que você não é eu

Como é possível que saiba

Que eu não sei

O que torna os peixes felizes?’

Hui argumentou:

‘Se eu não sendo você,

Não posso saber o que você sabe

Daí se conclui que você,

Não sendo peixe,

Não pode saber o que eles sabem’.

Disse Chuang:

‘Um momento:

Vamos retornar  
À pergunta primitiva.  
O que você me perguntou foi  
Como você sabe  
O que torna os peixes felizes  
Dos termos da pergunta  
Você sabe evidentemente que eu sei  
O que torna os peixes felizes  
Conheço a alegria dos peixes  
No rio,  
Através da minha própria alegria, à medida  
Que vou caminhando na beira do mesmo rio”.

(A via de Chuang Tzu, op. Cit., p.126-127).

*Aos meus pais Elena e Orlando, à  
minha querida avó Janira, ao meu irmão  
Tiago e ao Cristian que são testemunhas de  
minha história e acima de tudo são minha  
eterna fortaleza.*

## AGRADECIMENTOS

Ao Senhor meu Deus pela dádiva de ter nascido em uma família maravilhosa

Às Professoras Rossana Mara da Silva Moreira Thiré e Marysilvia Ferreira da Costa por terem confiado a mim este trabalho e por terem me aceitado nesta instituição antes que eu de fato tivesse concluído a graduação.

À CAPES pela bolsa de mestrado e a CAPES e ao PROCAD/CAPES pelo apoio financeiro.

À Professora Glória Dulce de Almeida Soares pela colaboração.

Ao Professor Fernando Costa e Silva Filho pela colaboração fundamental para a concretização deste trabalho.

À minha grande amiga e Professora Dilma Alves Costa que me orientou durante minha estada na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro e me conduziu ao mestrado.

À Professora Renata Autoun Simão por ter disponibilizado os equipamentos (Goniômetro e microscópio de força atômica) para a caracterização das amostras.

Ao Professor Sérgio Camargo por ter cedido espaço no Laboratório de Recobrimentos onde foi conduzida a maior parte dos experimentos.

Aos profissionais desta instituição em especial: Francisco (Secretaria), Carla e Adriana (MEV) e ao Heleno (AFM).

À Doris e Cristiane Xavier pelas ajudas “técnicas”

À Taíla, ao Jeremias e a Danile Cruz por terem me auxiliado nos primeiros passos no laboratório.

À todos que compartilham o Laboratório de Recobrimento.

Aos meus pais Elena e Orlando que são meus pilares.

À minha avó Janira pelas muitas orações

Ao meu irmão Tiago.

Às minhas primas: Elza, Valéria, Vanize, Viviane, Kelly, Sandras, Fabiana e Juninha por sempre estarem presentes.

Às minhas tias: Maria, Luiza e Alzira (em memória).

Ao meu primo André.

Às minhas amigas a começar pelas mais antigas: Geórgia, Gisele Delaia, Daniele, Vanessa, Cátia, Gisellinha, Gigi, Cláudia, Cinthya, Lívia, Tatiana, Ana Paula e Michele.

Aos amigos: Carlos, Vítor, Cristiano, Rodrigo, Miguel, Charles, André, Pablo e Geovânio.

Ao meu melhor amigo, meu fã, meu companheiro, motivador, e meu noivo, Cristian Fábio (Kiko).

Obrigada.

Resumo da Dissertação apresentada à COPPE/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Ciências (M.Sc.)

## IMOBILIZAÇÃO DE FIBRONECTINA NA SUPERFÍCIE DE SUPORTES POROSOS DE PHB PARA A APLICAÇÃO EM ENGENHARIA ÓSSEA

Roberta Helena Mendonça

Fevereiro/ 2008

Orientadoras: Rossana Mara da Silva Moreira Thiré

Maryslvia Ferreira da Costa

Programa de Engenharia Metalúrgica e de Materiais

O propósito deste trabalho foi produzir um novo material bio-sinalizado com aplicação potencial em engenharia óssea. No presente trabalho foram produzidos suportes porosos de PHB. As superfícies destes suportes porosos foram modificadas por duas rotas distintas: a primeira consistiu na modificação da superfície via aminólise e segunda consistiu na deposição de filmes de quitosana na superfície do material através da imersão dos suportes porosos em solução aquosa de quitosana. Às superfícies dos suportes porosos modificados ou não, foi adicionado fibronectina (FN). Os suportes porosos foram caracterizados por microscopia eletrônica de varredura (MEV), microscopia de força atômica (AFM), espectrometria de infravermelho (FTIR), espectroscopia por dispersão de raios X (EDS) e por medidas de ângulo de contato. Após a modificação com quitosana e com etilenodiamina, as superfícies dos suportes porosos mostraram-se morfologicamente e topograficamente diferentes. Os processos de modificação alteraram a composição química da superfície. Ensaios biológicos “*in vitro*” mostraram que a modificação da superfície com quitosana aumentou a adesão de osteoblastos. FN mostrou atividades diferentes quando immobilizadas em superfícies com diferentes tratamentos. A presença de FN na superfície dos suportes porosos de PHB sem modificação e modificados com quitosana aumentou a adesão de osteoblastos. A presença de FN na superfície aminolisada reduziu a adesão de osteoblastos.

Abstract of Dissertation presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science (M. Sc.)

FIBRONECTIN IMMOBILIZATION ON PHB SCAFFOLDS SURFACE FOR  
APPLICATION IN BONE ENGINEERING.

Roberta Helena Mendonça

February/ 2008

Advisors: Rossana Mara da Silva Moreira Thiré

Maryslvia Ferreira da Costa

Department: Metallurgy and Materials Engineering

The aim of this work were development a new material biosignaled applied to bone engineering. In the present work PHB scaffolds were produced. The scaffolds surfaces were modified by two different methods: aminolysis and deposition of chitosan films dipping PHB scaffolds on chitosan aqueous solutions. Fibronectin was added to scaffolds surface modified and unmodified. The scaffolds were characterized by scanning electron microcopy (SEM) and atomic force microscopy (AFM), dispersive X-ray spectrometry (EDS), infrared spectroscopy with Fourier Transform (FTIR) and contact angle measure. After the modification the scaffolds surfaces presented different morphology and topography. The surfaces chemical composition changes with the modification. “*In vitro*” tests using human osteoblasts showed that the surface modification with chitosan improved the osteoblasts adhesion. FN showed different activity when immobilized in different surfaces. The scaffolds unmodified and modified with chitosan and coated with FN improved the osteoblast adhesion. Scaffolds aminolyzed and coated with FN decreases the osteoblast adhesion.

# ÍNDICE GERAL

---

## CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO & OBJEIVO

---

1.1 Introdução .....	1
1.2 Objetivo .....	5

## CAPÍTULO II - REVISÃO DA LITERATURA

---

2.1 Biomateriais .....	6
2.2 Engenharia de Tecidos – Engenharia Óssea .....	8
2.2.1 - Suportes Porosos .....	10
2.3 Polihidroxicanoatos .....	14
2.4 Biodegradação .....	21
2.5 Modificação de Superfície .....	22
2.6 Imobilização de Macromoléculas .....	23
2.6.1 Métodos Físicos .....	25
2.6.2 Modificação por funcionalização química .....	28
2.7 – Fibronectina .....	34
2.7.1 - Interação Osteoblastos/ Fibronectina .....	34
2.8 – Quitosana .....	35

## CAPÍTULO III – METODOLOGIA

---

3.1 – Produtos químicos utilizados.....	37
---	----

3.2 - Equipamentos utilizados .....	39
3.3 - Produção de Suportes Porosos de Polihidroxibutirato .....	40
3.3.1 - Preparo da solução de PHB .....	40
3.3.2 - Determinação da concentração e da densidade da solução de PHB .....	41
3.3.3 - Classificação granulométrica e secagem do cloreto de sódio .....	41
3.3.4 - Confeção dos suportes porosos de PHB .....	42
3.3.5 – Acompanhamento da remoção de sal por condutivimetria - construção da curva-padrão de condutividade do cloreto de sódio .....	43
3.4 – Determinação da densidade de suportes porosos de PHB .....	44
3.5 - Volume de poros e porosidade dos suportes porosos de PHB .....	45
3.5.1 – Volume de poros e porosidade .....	45
3.6 - Determinação da espessura e do tamanho de poros dos suportes porosos de PHB ....	46
3.7 – Modificação de superfície de suportes porosos de PHB .....	47
3.7.1 – Aminólise .....	47
3.7.2 - Modificação com Quitosana .....	47
3.8 Imobilização de Fibronectina (FN) .....	48
3.9 - Dosagem de Proteína .....	48
3.10 - Associação de células HOB à superfície de suportes porosos de PHB .....	49
3.11 – Caracterização da superfície de suportes porosos de PHB .....	50
3.11.1 – Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectrometria por dispersão de energia de raios X (EDS).....	50
3.11.2 Microscopia de força atômica (AFM) .....	51

3.11.3 – Espectrometria de infra-vermelho com transformada de Fourier FTIR .....	52
3.11.4 - Ângulo de contato – energia de superfície de suportes porosos de PHB .....	53
3.12 – Estudo da degradação “ <i>in vitro</i> ” da superfície de suportes porosos de PHB .....	55
3.13 – Estudo da bioatividade “ <i>in vitro</i> ” da superfície de suportes porosos de PHB .....	56

## **CAPÍTULO IV – RESULTADOS & DISCUSSÃO**

---

4.1 – Produção de suportes poros de PHB .....	58
4.2 – Construção da – curva-padrão de condutividade .....	58
4.3 – Caracterização dos suportes porosos de PHB .....	61
4.3.1 – Morfologia .....	61
4.3.2 - Densidade dos suportes porosos de PHB .....	65
4.3.3 Porosidade dos suportes porosos de PHB .....	65
4.4 Aminólise .....	66
4.5 Adsorção de quitosana .....	78
4.6 – Imobilização de fibronectina na superfície de suportes porosos de PHB modificados ou não .....	88
4.7 Adesão de osteoblastos humanos (HOB) .....	93
4.8 Estudo da degradação “ <i>in vitro</i> ” da superfície de suportes porosos de PHB.....	97
4.9 Bioatividade .....	98

**CAPÍTULO V – CONCLUSÕES .....106**

---

**CAPÍTULO VI – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....109**

---

# ÍNDICE DE FIGURAS

---

<i>Figura 2.1 - Estrutura genérica do PHAs.....</i>	<i>15</i>
<i>Figura 2.2– Estrutura do polihidroxibutirato .....</i>	<i>16</i>
<i>Figura 3.1 – Representação esquemática do suporte poroso.....</i>	<i>47</i>
<i>Figura 4.1 – Suporte poroso de PHB obtido pela técnica e lixiviação de sal .....</i>	<i>58</i>
<i>Figura 4. 2 – Curva-padrão de condutividade para o cloreto de sódio.....</i>	<i>59</i>
<i>Figura 4.3 – Condutividade da água de lavagem de suportes porosos de PHB.....</i>	<i>60</i>
<i>Figura 4.4 – Micrografias eletrônicas de varredura da superfície de suportes porosos de PHB expostas ao ar.....</i>	<i>62</i>
<i>Figura 4.5 – Micrografia eletrônica de varredura da superfície dos suportes porosos de PHB formadas em contato com o vidro.....</i>	<i>63</i>
<i>Figura 4.6 – Micrografia eletrônica de varredura da superfície de fratura dos suportes porosos de PHB. (c) Detalhe da região ressaltada em (b); (d) Detalhe da região assinalada em (c).....</i>	<i>65</i>
<i>Figura 4.7 - Hidrólise básica de grupos éteres.(Adaptado de Solomons,2002).....</i>	<i>68</i>
<i>Figura 4.8 – Representação esquemática da aminólise (adaptado de Zhang, et al., 2007).69</i>	
<i>Figura 4.9 – Micrografias eletrônicas de varredura da superfície dos suportes porosos de PHB modificados com etilenodiamina por: 45 (a, b); 90 (c, d) e 120 minutos (e, f).....</i>	<i>71</i>
<i>Figura 4.10 – Imagem de microscopia eletrônica de varredura de um suporte poroso de PHB modificado com etilenodiamina por 90 min .....</i>	<i>72</i>

<i>Figura 4.11 – Imagens de microscopia de força atômica de suportes de PHB não modificado(a) e(c) (contraste topográfico e de fase respectivamente) e modificado com etilenodiamina por 90 min ((b)e (d) (contraste de fase e topográfico respectivamente))....</i>	<i>74</i>
<i>Figura 4.12 - Espectros de FTIR: suporte poroso de PHB não modificado(a) e modificado com etilenodiamina (b) .....</i>	<i>77</i>
<i>Figura 4.13 – Variação da energia de superfície e suas componentes polar e dispersiva .</i>	<i>79</i>
<i>Figura 4.14 – Variação da energia de superfície e suas componentes polar e dispersiva..</i>	<i>81</i>
<i>Figura 4.15 – Representação esquemática da adsorção eletrostática de quitosana à superfície de um suporte poroso de PHB negativamente carregado em função da hidrólise ácida.....</i>	<i>82</i>
<i>Figura 4.16 – Micrografias eletrônicas de varredura suportes de PHB não modificados (a) e (b) e modificados com quitosana por 3 (c) e (d); 12 (e) e (f) 24 h (g) e (h).....</i>	<i>84</i>
<i>Figura 4. 17 – Imagens de microscopia de força atômica de suportes de PHB não modificado (a) e (c) (contraste topográfico e de fase respectivamente) modificado com quitosana por 12 h (b) (d) (contraste de fase e topográfico respectivamente.....</i>	<i>86</i>
<i>Figura 4.18 – Micrografias eletrônicas de varredura da superfície de fratura de suportes PHB modificados por 24h. As regiões indicadas correspondem, respectivamente aos subseqüentes.....</i>	<i>87</i>
<i>Figura 4.19 - Espectros de FTIR: (a) suporte poroso de PHB; (b) Suporte poroso de PHB modificado com quitosana e (c) quitosana.....</i>	<i>89</i>
<i>Figura 4. 20 – Micrografias eletrônicas de varredura da superfície de suportes porosos recobertos com FN: não modificado (a) e (b), modificados com etilenodiamina por 90 min (c) e (d) e modificados com quitosana por 12h (e) e (f ).....</i>	<i>94</i>

*Figura 4.21 – Imagens de microscopia eletrônica de varredura das superfícies dos suportes porosos de PHB após o ensaio de degradação em tampão PBS pH 7,4 e  $T = 3\text{ }^{\circ}\text{C}$  .....102*

# ÍNDICE DE TABELAS

---

<i>Tabela 2.1 - Efeito do tratamento da superfície de filmes de PHB na adesão celular (Yang et al. 2002).</i> .....	29
<i>Tabela 2.2 - Evolução do ângulo de contato e Número de grupos – COOH terminais na superfície na superfície de filmes de PHB tratados com KOH em função do tempo de hidrólise.</i> .....	30
<i>Tabela 2.3 – Dados de tensão x deformação de suportes de PLLC aminolisados ou não (ZHU, et al., 2007).</i> .....	32
<i>Tabela 2.4 - ângulo de contato das superfícies de filmes de PET não modificados, aminolisado, com FN imobilizada.</i> .....	33
<i>Tabela 3.1 – Concentração iônica da solução SBF em comparação ao sangue humano.</i> ....	57
<i>Tabela 4.1 - Variáveis utilizadas no cálculo da densidade de suportes porosos de PHB.</i> ....	66
<i>Tabela 4.2 - Variáveis utilizadas no cálculo da porosidade dos suportes porosos de PHB.</i> .....	67
<i>Tabela 4.3 - Composição atômica de suportes porosos de PHB modificados ou com etilenodiamina.</i> .....	75
<i>Tabela 4.4 - Ângulo de contato e energia de superfície de suportes porosos de PHB modificados e não modificados com etilenodiamina.</i> .....	78

*Tabela 4.5 - Composição atômica de suportes porosos de PHB modificados ou quitosan..88*

*Tabela 4.6 - Ângulo de contato e energia de superfície de suportes porosos de PHB modificados e não modificados com quitosana .....91*

*Tabela 4.7 - Dosagem de proteínas em suportes porosos de PHB modificados ou não com etilenodiamina e recobertos com FN..... 95*

*Tabela 4.8 - Associação de células HOB à superfície de suportes porosos de PHB .....98*

*Tabela 4.9 – Razão Ca/P na superfície de suportes porosos de PHB modificados ou não..... 103*

# LISTA DE SÍMBOLOS

---

AFM – microscopia de força atômica

EDS – espectrometria por dispersão de energia de raios X

FN- fibronrtina

FTIR – Espectrometria de infra-vermelho com transformada de Fourier

HOB – osteoblastos humano

LBL - layer-by-layer

MEC – matriz extracelular

MEV – microscopia eletrônica de varredura

PHB – Polihidroxibutirato

PHAs – Polihidroxialcanoatos.

# CAPÍTULO I

---

## INTRODUÇÃO & OBJETIVO

### 1.1 Introdução

A engenharia de tecidos é uma nova área tecnológica que visa reparar e ou regenerar tecidos danificados com a adição de biomateriais (suportes, matrizes tridimensionais, arcabouços, estruturas, etc) combinados com células e fatores estimulantes apropriados. A engenharia de tecidos tem sido considerada como uma alternativa potencial ao transplante de órgãos (CAIA, *et al.*, 2005).

Atualmente, muita atenção tem sido dada à reconstrução de ossos humanos, uma vez que, o uso de enxertos ósseos em práticas clínicas apresenta vários inconvenientes. As terapias atuais consistem na retirada de parte do osso do paciente ou de um doador para inseri-lo na região danificada (MEIJER, *et al.*, 2007). Os transplantes podem ser feitos de forma autóloga, homóloga ou heteróloga. Como alternativa aos transplantes autólogos pode-se fazer uso de ossos de cadáveres humanos ou ossos de animais alocados em bancos de ossos. Desta forma, não é necessário remover tecido ósseo do próprio paciente. Contudo, a utilização de cadáveres humanos ou de ossos de animais pode conduzir a problemas tais como: infecções causadas por vírus ou bactérias e repostas imunes do tecido hospedeiro (CANCEDDA *et al.*, 2007). A engenharia de tecidos ósseos pode, potencialmente, prover soluções alternativas para tais problemas, com a utilização de suportes porosos

tridimensionais projetados para permitir a migração e a proliferação celular, vascularização e difusão de nutrientes (S'ANCHEZ-SALCEDO *et al.*, 2007).

A idéia básica da engenharia de tecidos no campo de pesquisa voltada para a engenharia óssea é a formação de um novo osso “*in vitro*” ou “*in vivo*” através da combinação de materiais osteocondutivos, células osteopotententes e fatores de crescimento apropriados. A restauração da funcionalidade de ossos humanos utilizando técnicas de engenharia óssea requer freqüentemente o uso de suportes porosos temporários. Sob o aspecto da engenharia de materiais, o primeiro passo para a reconstrução de um órgão ou tecido é a seleção do suporte os quais podem ser poliméricos, metálicos ou cerâmicos (LORCAN, *et al.*, 2006).

Os polímeros biodegradáveis vêm sendo amplamente utilizados na construção de suportes porosos aplicados à engenharia de tecidos, incluindo a de ossos e outros tecidos mineralizados (HUTMACHER, 2000). A aplicação destes materiais na área médica depende da biocompatibilidade que é definida como: “a habilidade do material executar uma resposta tecidual apropriada a uma aplicação específica” (MEYER, *et al.*, 2003). A biocompatibilidade do implante depende de sua composição química, de sua estrutura cristalina e de seus produtos de degradação (DOREMUS, 1992).

Dentre os polímeros biodegradáveis destaca-se o polihidroxibutirato (PHB) que é um poliéster alifático natural obtido por fermentação bacteriana utilizando fontes de carbono renováveis. O PHB é um bom material para confecção de suportes porosos devido ao fato de ser citocompatível e de possuir propriedades mecânicas similares às do polipropileno isotático, além de ser biocompatível a vários tipos celulares tais como

osteoblastos, células epiteliais e condrócitos ovinos (HONG, 2006). Estudos das propriedades de suportes confeccionados utilizando PHB mostram que células aderem, espraíam e se proliferam sobre a superfície destes. (CAIA, *et al.*, 2005).

A crescente demanda por substituição funcional tem permitido a evolução dos biomateriais no sentido de um sistema biointegrado. Assim, espera-se de um implante artificial que haja biointegração entre este e o bio-ambiente. Isto implica que os fenômenos que ocorrem na relação entre o implante e os tecidos do receptor não induzam nenhum efeito desfavorável (SHIN, 2007). Projetar biomateriais que cumpram todas as necessidades não é uma tarefa simples. Uma aproximação pode ser obtida fabricando-se biomateriais com as propriedades de volume adequadas seguidas por um tratamento especial para realçar as propriedades de superfície. Desta maneira almeja-se obter biomateriais “ideais” com atributos de superfície adequados e propriedades de volume também (LORCAN, *et al.*, 2006).

No caso da engenharia óssea, a construção e a manutenção de uma interface apropriada à formação de tecido ósseo é um ponto crítico para o sucesso na utilização de suportes. Propriedades de superfície, tanto dos materiais quanto das células, influenciam os eventos observados na interface célula-material, resultando ou não na biocompatibilidade deste. Desta forma, é essencial que a superfície do material induza a adesão celular e subsequente formação de tecido (YANG, *et al.*, 2002).

As técnicas de micro-fabricação de superfície tem sido extensamente utilizadas para o controle espacial de cultura de células. Muitas estratégias tem sido empregadas na modificação de cargas superficiais, hidroflicidade e topografia para regular as funções

celulares como, por exemplo, adesão e diferenciação. Em adição, vários tipos de biomoléculas vem sendo utilizadas para regular as funções celulares incluindo crescimento, diferenciação e apoptose (SHIN, 2007). Tem sido mostrado que a modificação da superfície de materiais com componentes de matriz extracelular (MEC), fatores de crescimento e proteínas envolvidas no processo de diferenciação celular pode melhorar sua biocompatibilidade. Acredita-se que a adição de certas seqüências de proteína de MEC pode agregar receptores integrais à superfície do biomaterial (CAIA *et al.*, 2005).

O reconhecimento de biomateriais por parte das células é essencialmente baseado em interações mediadas por integrinas (proteínas heterodiméricas e transmembranares que reconhecem proteínas de matriz celular como fibronectina, vitronectina, laminina e colágeno) e depende também das características físico-químicas do material (ITO, *et al.*, 1997). A adsorção de fibronectina, uma das principais proteínas de MECs, e/ ou de uma de suas pequenas seqüências de peptídeos (arginina – glicina – ácido aspártico ou RGD), à superfície de materiais pode promover a adesão celular mediada por integrinas (SHIN, 2007).

Diversas estratégias têm sido implementadas com o propósito de melhorar a estabilidade interfacial no contato osso-implante. Uma destas estratégias é a biomimetização de superfícies utilizando moléculas específicas de matriz extracelular que promovam a integração das células à superfície dos implantes (CAIA, 2005).

No presente trabalho, foram produzidos suportes porosos de PHB pelo método de lixiviação de sal. A superfície desses suportes foi modificada por dois processos distintos: aminólise e deposição de quitosana. O enfoque das modificações de superfície foi prover

condições adequadas à imobilização da proteína fibronectina (FN) a fim de biomimetizar a superfície para induzir a adesão de osteoblastos.

## **1.2 Objetivo**

O objetivo do presente trabalho foi desenvolver um biomaterial biologicamente ativado para aplicação em engenharia óssea, a fim de induzir a adesão de osteoblastos humanos (HOB). Para tal foram realizadas as seguintes etapas:

- Produção de suportes porosos de PHB pelo método de lixiviação de sal;
- Modificação da superfície dos suportes porosos de PHB por duas rotas distintas visando a formação de sítios ativos para a imobilização da proteína fibronectina (FN): A primeira consistiu na modificação química via aminólise através do tratamento do suporte poroso com etilenodiamina. A segunda consistiu em um tratamento físico onde quitosana foi depositada na superfície dos suportes porosos;
- Avaliação dos efeitos da modificação de superfície na imobilização de fibronectina e na adesão de osteoblastos humanos.

# CAPÍTULO II

---

## REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Biomateriais

Biomaterial é qualquer substância (outra que não droga) ou combinação de substâncias, sintética ou natural, que possa ser utilizada por um período de tempo completa ou parcialmente como parte de um sistema que trate, aumente ou substitua qualquer tecido, órgão ou função do corpo (HELMUS, 1995).

Quanto ao tipo do material constituinte, os biomateriais podem ser: polímeros, metais, cerâmicas e macromoléculas naturais. Nos últimos anos, os materiais poliméricos têm recebido destaque devido à sua vasta aplicabilidade no corpo humano (BLUNK, 2003). Um dos fatores que têm atraído a atenção para a utilização de polímeros é a possibilidade de alterar grupamentos químicos pertencentes à arquitetura macromolecular das cadeias, o que pode auxiliar na fabricação de materiais que induzam interações específicas entre o biomaterial e o tecido hospedeiro (ORÉFICE, 2005).

Os biomateriais podem ser classificados quanto a sua bioatividade e biocompatibilidade. A biocompatibilidade é a habilidade de um material desempenhar com uma resposta tecidual apropriada em uma aplicação específica. Enquanto que a bioatividade é uma propriedade inerente a alguns materiais de participarem em reações biológicas

específicas ou a capacidade que alguns materiais possuem de provocar a ligação com tecidos vivos, sem formar a camada fibrosa que o separa do tecido (WILLIAMS, 1982)

Tendo em vista que a biocompatibilidade é uma propriedade importante para o uso humano de biomateriais, fica evidente a necessidade de se fazer estudos “*in vitro*” e “*in vivo*” do comportamento celular na interface com esses materiais. Modelos animais são essenciais para prover informações sobre as reações biológicas de um implante, porém, os resultados podem ser de difícil interpretação a nível celular em função do grande número de complexidade de eventos que estejam ocorrendo. Abordagens “*in vitro*” superam essas limitações e representam um sistema válido de análise de resposta celular quanto a morfologia, dano, secreção e proliferação (CRUZ, 1987).

Os ensaios “*in vitro*” são mais rápidos, de baixo custo, não envolvem problemas éticos e simulam o desempenho do material antes da sua implantação. Os testes “*in vivo*” utilizam procedimentos de implantação, fornecem resultados mais realísticos do comportamento do material e permitem o exame de ambas as respostas locais – tecido e sistêmicas - se presentes. Os testes “*in vivo*” permitem a seleção final do material indicado para cada prótese. É no teste “*in vivo*” que se faz o estudo da resposta inflamatória, aguda e crônica e a relação destas no período tardio, com sucesso ou insucesso do biomaterial (CRUZ, 1987).

Nas últimas décadas, têm sido desenvolvido biomateriais que sirvam como suporte físico e atuem como um substrato adesivo para células durante cultura “*in vitro*” para subsequente implantação. Assim esses biomateriais deverão viabilizar a regeneração do tecido hospedeiro em termos de morfologia e de atividade. Desta forma à medida que um

tecido sadio já estivesse consolidado, não haveria necessidade da presença do biomaterial, o qual poderia ser, então, removido ou degradado. Esta idéia de conduzir o processo de regeneração de tecidos e órgãos levou o estabelecimento da chamada Engenharia de Tecido a qual visa o estabelecimento de uma nova estratégia para gerar novos biomateriais (ZHAO *et al.*, 2003).

## **2.2 Engenharia de Tecidos – Engenharia Óssea**

A engenharia de tecidos é uma área multidisciplinar que aplica os princípios e métodos da engenharia e da ciência da vida juntos para desenvolver substitutos biológicos que restaurem, mantenham e melhorem funções teciduais ou mesmo substituam tecidos degenerados. A engenharia de tecidos consiste no desenvolvimento e manipulação de moléculas, células, tecidos, ou órgãos crescidos em laboratório para substituir ou apoiar a função de partes do corpo defeituosas ou danificadas (LANGER, *et al.*, 2004).

Avanços no campo da engenharia de tecidos foram motivados pela necessidade de regenerar tecidos danificados por doenças degenerativas, traumas por acidentes ou mesmo a perda de órgãos ou de suas funções. O transplante de tecidos e órgãos vem sendo realizado desde 1954, porém as cirurgias são em número limitado devido a vários fatores. A discrepância entre o número de pacientes que necessitam de um transplante e a escassez de doadores que possam disponibilizar órgãos tem sido cada vez maior. Além disso, risco de infecção, rejeição, desenvolvimento de tumores e efeitos colaterais indesejáveis também

são passíveis de ocorrer. A engenharia de tecidos e o transplante de células surgiram para minimizar esses efeitos (SHIN, 2007).

A engenharia de tecidos tem uma vantagem particular sobre as terapias que utilizam drogas, pois pode promover uma solução permanente para o problema de falência do órgão. De forma geral existem três técnicas principais que são utilizadas em engenharia de tecidos (BARBANTI, *et al.*, 2005):

(i) uso de células isoladas ou substitutos celulares como peças de recolocação celular;

(ii) uso de materiais não celulares (acelular) capazes de induzir a regeneração de tecidos;

(iii) uso de combinação de células e materiais (tipicamente na forma de suportes).

A infusão de células isoladas ou substitutos celulares evitam as complicações cirúrgicas permitindo recolocar somente aquelas células que fornecem a função desejada, além da manipulação das células antes da injeção/ infusão. Este método permite o preenchimento de defeitos de vários tamanhos e formas com o mínimo de intervenção cirúrgica. Sua limitação inclui a falha das células em manter sua função no local recipiente e rejeição imunológica (FUCHS *et al.*, 2001).

Os materiais utilizados em engenharia de tecidos servem, normalmente, tanto como suporte físico quanto como substrato para adesão celular durante a cultura “*in vitro*” e subsequente implantação (ZHAO *et al.*, 2003). O uso de materiais para a reconstrução

tecidual depende da purificação e produção em grande escala, de moléculas sinalizadoras apropriadas, tais como fatores de crescimento, moléculas de adesão e em muitos outros casos do desenvolvimento de métodos para que estas moléculas atinjam seu alvo.

A semeadura de células sobre e dentro de suportes porosos é o método mais comum utilizado em engenharia de tecidos. Muitos esforços têm sido feitos no intuito de controlar as interações dos suportes porosos com células. Considera-se que a concepção da engenharia de tecidos está extensamente baseada no sistema célula-suporte no qual o polímero biodegradável funciona por um certo período como substrato ou suporte poroso para a formação de tecidos (SHIN *et al.*, 2007).

### **2.2.1 - Suportes Porosos**

O desenvolvimento de materiais porosos tridimensionais que sirvam como suporte para o crescimento de células é de interesse particular da engenharia regenerativa e da engenharia de tecidos devido à capacidade destes materiais de mimetizar as condições naturais da matriz extracelular em termos de estrutura, composição química e propriedades mecânicas. O desenvolvimento destes suportes envolve não só a utilização de materiais biocompatíveis, mas também de materiais biodegradáveis, os quais devem ser adequadamente processados para obter matrizes porosas com a morfologia apropriada (FILIPCZAK, 2005).

A função dos suportes porosos temporários é direcionar o crescimento e migração de células nas vizinhanças do tecido ou o crescimento de células em sua estrutura de poros.

Os suportes porosos devem, no entanto, prover condições apropriadas para a adesão celular, proliferação, e diferenciação e, em alguns casos, também a migração celular. Esses requerimentos críticos podem ser alcançados pela seleção do material apropriado para construção destes (FILIPCZAK, 2005).

O primeiro passo para a reconstrução de um órgão ou tecido visa à seleção do suporte poroso para as células a qual leva em consideração o tipo, o local da lesão e a sua extensão, podendo seguir basicamente duas estratégias de aplicação, quando preparado com polímeros biorreabsorvíveis (polímeros que são eliminados por vias naturais através da simples “filtração dos produtos de degradação” ou da sua metabolização). Na primeira, o material polimérico é desenvolvido de forma a suportar física e mecanicamente as células, da inoculação até o re-implante no organismo hospedeiro e o implante do conjunto polímero e células ocorre com o tecido prematuro formado. O polímero é então remodelado pela degradação “*in vivo*” numa razão proporcional ao crescimento celular e à solicitação mecânica (BARBANTI *et al.*, 2005). Na segunda estratégia, o implante ocorre com tecido maduro formado. O suporte polimérico é dimensionado com propriedades mecânicas e tempo de degradação adequados para a inoculação das células até a sua inserção em um bioreator onde ocorrerá a formação do tecido maduro. Nesta etapa, as células semeadas proliferam e secretam matriz extracelular durante a cultura *in vitro*, enquanto o polímero é degradado e reabsorvido gradualmente, dando espaço para a proliferação celular e formação do tecido no reator biológico. Somente após a formação do tecido, o implante é inserido no organismo.

A biodegradabilidade dos polímeros é passível de modificação através do designer molecular. Alguns polímeros contêm ligações químicas que podem sofrer hidrólise quando

expostas a ambientes aquosos, e outros polímeros podem ser degradados por células ou pela ação de enzimas. Por estas razões, materiais poliméricos têm sido extensivamente estudados para serem aplicados na construção de suportes aplicados à engenharia óssea (LIU, *et al.*, 2004). Exemplos de polímeros biodegradáveis utilizados em engenharia de tecidos são: poli(ácido glicólico) (PGA), poli(ácido lático) (PLA) e seus co-polímeros poli(ácido lático-co-ácido glicólico) (PLGA) policaprolactona (PCL) e polihidroxibutirato (PHB) (FILIPCZAK, 2005).

Várias tecnologias são utilizadas na construção de suportes porosos. As principais são: lixiviação de partículas, borbulhamento de gás, eletrofiliação, prototipagem rápida e separação de fase induzida termicamente (LIU, *et al.*, 2004). Dentre estas técnicas, a lixiviação de sal é a mais simples e envolve o uso de agentes porogênicos solúveis em água, tal como o sal cloreto de sódio (MIKOS *et al.*, 1993; MIKOS *et al.*, 1994). Nesta técnica, a porosidade, que é definida como a porcentagem de espaços vazios no sólido, pode (KARAGEORGIU *et al.*, 2005) ser controlada pela quantidade de sal adicionado e o tamanho dos poros pelo tamanho dos cristais (MIKOS *et al.*, 1993; MIKOS *et al.*, 1994).

DENGA, *et al.* (2002), investigaram a biocompatibilidade de suportes porosos confeccionados a partir da mistura dos polímeros polihidroxibutirato (PHB) e polihidroxibutirato-co-hidroxihexanoato (PHBHHx). Os suportes porosos constituídos por PHBHHx/PHB na proporção de 60% (p/p) mostraram acentuado crescimento e proliferação de condrócitos.

SADER (2003), estudou suportes porosos de PHB preparados pelo método de lixiviação de partículas. Os suportes produzidos promoveram a deposição espontânea de

camada de fosfato de cálcio, o que é um indicativo de bioatividade. Estudos da interação de células ósseas de camundongo em suportes porosos de PHB mostraram que o mesmo é biocompatível e não-citotóxico. Os suportes porosos de PHB propiciaram a adesão e a proliferação de células osteoblásticas de camundongo.

Embora muito se tenha avançado em engenharia de tecidos problemas práticos ainda persistem. Isto pode ser, em parte, devido à natureza multidisciplinar deste campo que integra conhecimentos de:

- (i) propriedades dos materiais constituintes do suporte;
- (ii) micro e macroestrutura dos suportes porosos;
- (iii) biomecânica;
- (iv) biologia celular;
- (v) biocompatibilidade e reações de defesa do hospedeiro e
- (vi) cirurgia (BARBANTI, 2005).

Quatro problemas práticos podem ser identificados:

- (i) A taxa de degradação “*in vivo*” é geralmente difícil de controlar.
- (ii) A eficiência de semeadura de células é baixa. Geralmente as células são encontradas bem próxima à superfície do suportes porosos, mas não no interior.
- (iii) Os produtos de degradação dos suportes porosos podem ser citotóxicos. O suporte poroso também pode provocar inflamação local. Por exemplo, a degradação do

poli(ácido lático) pode resultar na construção de blocos ácidos que podem iniciar reposta inflamatória.

(iv) O risco de inflamação é relativamente alto quando há pouca vascularização, isto é, lenta drenagem de produtos de degradação dos suportes porosos no sítio de implantação. Células podem se diferenciar quando no interior dos suportes porosos. Condrócitos, por exemplo, tendem a se diferenciar depois de difundido em suportes porosos poliméricos “*in vitro*” (DENGA, *et al.*, 2002)

O entendimento fundamental sobre o comportamento dos suportes porosos é ainda muito limitado. É necessário aperfeiçoar os biomateriais de forma que estes possam acomodar proliferação celular e deposição de matriz extracelular em todo o volume dos suportes porosos (JANSEN, *et al.*, 2005).

Uma nova classe de biopolímeros, polihidroxicanoatos (PHAs), que são sintetizados por várias bactérias como carbono intracelular e compostos de armazenamento de energia, vem sendo estudadas para várias aplicações médicas potenciais. É sugerido que polihidroxicanoatos possam ser utilizados como implantes na forma de suportes porosos em engenharia de tecidos (DENGA, *et al.* 2002).

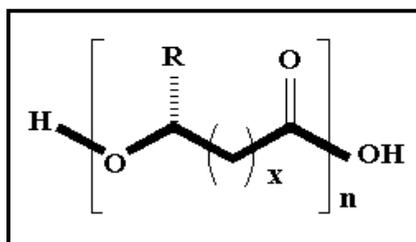
### **2.3 Polihidroxicanoatos**

Uma das famílias de polímeros mais atrativas, pois além de biorreabsorvíveis, eles também são biocompatíveis, podendo ser utilizados em diversas aplicações na área médica

é a dos polihidroxicanoatos (PHAs). Os PHAs são poliésteres produzidos por microorganismos sob condições de crescimento não balanceadas. São geralmente biodegradáveis e por esta razão são atrativos como biomateriais para a engenharia de tecidos. No entanto, somente alguns PHAs como, por exemplo, o polihidroxibutirato (PHB) e seus copolímeros de 3-hidroxibutirato e 3-hidroxivalerato (PHBV), poli 4-hidroxibutirato (P4HB) e o copolímero poli(4-hidroxibutirato) (P4HB), copolímero de 3-hidroxibutirato e 3-hidroxihexanoato (PHBHHx) e polihidroxioctanoato (PHO) são disponíveis em quantidades suficientes para aplicação em pesquisa (MADISON *et.al.*, 1999).

O processo de fermentação utilizado comercialmente para a produção de PHAs envolve microorganismos que podem crescer em grandes tanques sobre uma variedade de substratos incluindo açúcares naturais, etanol e mesmo misturas gasosas de dióxidos de carbono e hidrogênio (KARLSON *et al.*, 1998).

Os PHAs, são polímeros semicristalinos termoplásticos que possuem estrutura genérica como mostrado na Figura 2.1.



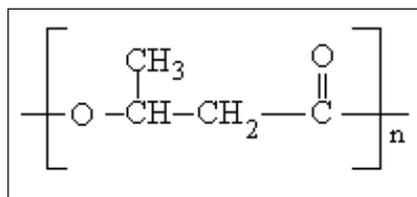
**Figura 2.1** - Estrutura

genérica do PHAs.

O tamanho da cadeia polimérica pode variar fornecendo um grande número de PHAs com propriedades físicas e propriedades mecânicas variadas. Na estrutura genérica R

pode ser hidrogênio ou cadeias hidrocarbônicas com comprimentos em torno de 13 átomos de carbono, e x pode ser um ou mais átomos de carbono. Variações em R e x têm efeito sobre a hidrofobicidade, temperatura de transição vítrea (Tg), temperatura de fusão (Tm) e no grau de cristalinidade.

Quando R é o grupo metil e  $x = 1$ , o polímero é o PHB como ilustrado na Figura 2.2.



*Figura 2.2– Estrutura do polihidroxibutirato*

O PHB é o polímero mais conhecido da classe dos PHAs. O PHB contém unidades repetidas de (R) 3- hidroxibutirato ((R)-3HB) e, os monômeros são polimerizados até pesos moleculares que variam de 200.000 a 300.000.000 Da.

### **2.3 Polihidroxibutirato**

O PHB foi primeiramente isolado e caracterizado entre 1923 e 1926 pelo microbiologista francês Maurice Lemoigne. É um poliéster linear isotático de origem

bacteriana e é o mais comum e o mais produzido entre os PHAs. Pode ser produzido por um número variável de diferentes bactérias como, por exemplo, *Alcaligenes eutrophus*, *Azotobacter vinelandii*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas putida*, e outras. O PHB isolado no processo bacteriano possui cristalinidade entre 55 e 88%, ao passo que as moléculas no interior da bactéria são amorfas e existem como inclusões insolúveis em água (HONG *et al.*, 2006). O PHB é utilizado pelas bactérias como material de reserva energética (ZHAO *et al.*, 2003).

A biossíntese microbiana do PHB começa com a condensação de duas moléculas de acetil-Coenzima A dando origem à acetoacetil – Coenzima A com subsequente redução do hidroxibutiril-Coenzima A. Este último composto é então usado como monômero para a polimerização resultando no PHB (TAGUCHI *et al.*, 2003).

O PHB é biocompatível com várias linhas celulares, incluindo osteoblastos, células epiteliais e condrócitos ovinos. Pesquisas têm obtido boas aproximações para avaliar a biocompatibilidade de materiais implantados através do estudo de alterações estruturais em moléculas que estão envolvidas na adesão celular em culturas de células em PHB (HONG *et al.*, 2006).

O peso molecular (Mw) do PHB produzido por bactérias selvagens é usualmente na faixa de  $1 \times 10^4$  a  $3 \times 10^6$  g/mol com polidispersão na ordem de dois. A temperatura de transição vítrea é em torno de 4°C ao passo que a  $T_m$  é em torno de 180°C, como mensurado em análises calorimétricas. A densidade das formas cristalinas e amorfas são em torno de 1,26 e 1,18g/cm<sup>3</sup>, respectivamente. A extensão à quebra para o PHB é de aproximadamente 5% o que é, todavia, mais baixa do que a do polipropileno, 400%. Assim,

quando comparado ao polipropileno, o PHB aparece como um material mais duro e mais quebradiço (HAYASHI, 1994).

A excelente regularidade estereoquímica do PHB deve-se à sua origem natural. A estrutura cristalina do PHB consiste de uma célula unitária ortorrômbica do tipo  $P2_12_12_1-D^4_2$ , com parâmetros de rede  $a = 5,76 \text{ \AA}$ ,  $b = 13,20 \text{ \AA}$  e  $c = 5,96 \text{ \AA}$  (INOUE *et al.*, 1992).

A alta pureza do PHB resulta em um baixo grau de nucleação heterogênea, conduzindo ao crescimento de grandes esferulitos, os quais são responsáveis pelo seu comportamento quebradiço. O PHB forma cristais lamelares extremamente finos que são organizados em cristais simples e alongados quando crescem a partir de soluções diluídas ou esferulitos quando crescem a partir do estado fundido. A espessura lamelar nos esferulitos é em torno de  $50 \text{ \AA}$  e em cristais crescidos de soluções podem ser menores. A velocidade de cristalização do PHB puro é relativamente baixa quando comparada com os polímeros sintéticos comuns, mostrando um máximo de temperatura na faixa de  $55$  a  $60^\circ\text{C}$  (RENSTAD, *et al.*, 1997). A baixa densidade de nucleação é também responsável pela notável incapacidade dos PHAs intracelulares cristalizarem “*in vivo*” (SUDESH *et al.*, 2000).

Quando o PHB é cristalizado a partir do estado fundido, os esferulitos, usualmente, contêm trincas. Sob tensão as trincas já existentes crescem, levando o polímero a uma condição quebradiça. As trincas podem ser radiais ou circulares. As radiais ocorrem em esferulitos cristalizados à temperatura ambiente. As circulares aparecem principalmente em filmes cristalizados a altas temperaturas, após terem sido resfriados a temperatura ambiente (HAYASHI, 1994)

As propriedades mecânicas do PHB dependem do processo de cristalização (têmpera ou resfriamento lento). Durante o resfriamento rápido, o grau de cristalinidade é menor, e cristalitos menores são formados. Durante o resfriamento lento, esferulitos maiores são formados. Dois tipos de quebra são encontrados nos esferulitos de PHB puro. Quebras circulares no centro e trincas. O PHB forma esferulitos individuais largos os quais dependem de uma baixa densidade de nucleação. No caso de misturas de PHB com outros polímeros, obtém-se esferulitos menores. Os esferulitos grandes são responsáveis pelas propriedades mecânicas ruins.

O PHB é termicamente instável. A degradação térmica ocorre através de um mecanismo de cisão aleatória de cadeia envolvendo o processo de transferência de hidrogênio da espécie  $\beta$ -CH por meio de um não-radical. Na faixa de temperatura de 170-200°C, a cisão de cadeia resulta em uma rápida diminuição do peso molecular. O PHB é completamente volatilizado entre 250-300°C, sendo os principais produtos oligômeros diméricos, triméricos e tetraméricos, junto com ácido crotônico (EL-HADI, 2002).

A taxa de degradação do PHB pode ser aumentada com a adição de agentes plastificantes. Aditivos amorfos ou hidrofílicos levam a alta absorção de água e aceleram o processo de hidrólise. A adição de um segundo componente adequado melhora a degradação de PHAs (ARKIN *et al.*, 2002).

VANIN, *et al.* (2004), realizou um estudo de avaliação da degradação “*in vitro*” da blenda biorreabsorvível polihidroxibutirato (PHB) / poli(L-ácido lático) na forma de filmes obtidos pelo método de evaporação do solvente. Os filmes obtidos foram imersos em solução tampão fosfato salino, PBS, (pH 7,4) por 12 meses em banho termostatizado a

37°C. Os resultados mostraram que a blenda PHB/PLLA é imiscível em todas as composições estudadas, apresentando morfologia com separação de fases. O PLLA perdeu propriedades mecânicas de tração mais rapidamente que o PHB, durante o processo de degradação, tornando-se mais quebradiço. Através da caracterização das amostras degradadas concluiu-se que o PLLA degrada-se mais rapidamente que o PHB e que durante a degradação têm-se um aumento da cristalinidade das amostras. Verificou-se que, apesar do PHB apresentar propriedades mecânicas inferiores às do PLLA, o PHB consegue mantê-las por mais tempo, enquanto que o PLA apresenta-se quebradiço em poucos meses de ensaio. Pode-se sugerir então que as blendas apresentam vantagens em relação ao tempo de degradação e propriedades mecânicas quando comparadas ao PLLA puro. A análise da perda de massa de filmes de PHB em função da temperatura mostrou que, a diferença de perda de massa não foi muito acentuada na faixa de temperatura de 0 a 255°C. Nesta faixa as diferenças de perda de massa variou de 0 a 2 %. À temperaturas acima de 300°C maior perda de massa foi observada para filmes cujo período de degradação foi de 12 meses.

O PHB apresenta boa permeabilidade ao oxigênio, boa resistência aos raios ultravioleta, mas é pouco resistente a ácidos e bases. É solúvel em clorofórmio e outros e em outros solventes hidrocarbonetos halogenados. Apesar da sua biodegradabilidade, os PHAs tem boa resistência à água e a vapor e são estáveis sob condições normais de estocagem e durante seu uso. Os ambientes onde o PHB se degrada na ordem da taxa de degradação do mais ativo são: esgotos anaeróbicos, solos úmidos, sedimentos marinhos, esgoto aeróbicos, rumem de gado, água do mar, “*in vivo*” (subcutâneo ou intramuscular) e “*in vitro*” a uma taxa lenta (ARKIN *et al.*, 2002).

## 2.4 Biodegradação

A biodegradação depende de vários fatores tais como atividade microbiana e fatores ambientais, área exposta, mistura, temperatura, pH e peso molecular. Para os PHAs a composição e a cristalinidade assumem papel importante na biodegradação (GROSS, *et al.*, 1989). O balanço hidrofílico hidrofóbico do polímero também afeta a biodegradabilidade. A superfície do polímero é o primeiro local de ataque na reação de hidrólise heterogênea (REDDY, *et al.*, 2003).

Os seguintes fatores aceleram a degradação do polímero:

- (i) Cadeia principal mais susceptível à hidrólise;
- (ii) Grupos finais mais hidrofílicos;
- (iii) Grupos mais sujeitos à hidrólise, mais reativos na cadeia principal;
- (iv) Menor cristalinidade;
- (v) Maior porosidade.

Microorganismos secretam enzimas que quebram o polímero em blocos constituintes, chamados hidroxiácidos, os quais são utilizados pelos microorganismos como fonte de carbono. A principal enzima para a degradação do PHB em oligômeros é a PHB *depolimerase*. A biodegradação de PHAs sob condições aeróbicas resulta em dióxido de carbono e água, contudo, sobre condições anaeróbicas, os produtos de degradação são dióxido de carbono e metano (BRANDL, *et al.*, 1995). Em sistemas biológicos os

polímeros naturais são geralmente degradados por hidrólise seguida de oxidação (REDDY, *et al.*, 2003).

## **2.5 Modificação de Superfície**

A modificação da superfície de suportes porosos de biomateriais é desejável para atender às demandas de aplicação sem, no entanto, modificar as demais propriedades do suporte tais como resistência mecânica ou propriedades térmicas. Efetivamente modificações de superfícies incluem mudanças de grupos funcionais, de carga superficial, hidrofiliabilidade, hidrofobicidade, e molhabilidade (YANG *et al.*, 2002). Em engenharia de tecidos não é necessário somente que os suportes porosos sejam biocompatíveis e biodegradáveis, é essencial que a superfície destes induza a adesão celular e subsequente crescimento de tecido. No caso ideal, é desejável que as propriedades de superfície do suporte poroso sejam ajustadas à aplicação pretendida. (YA-WU *et al.*, 2005).

As propriedades de superfície de quais quer dispositivos é extremamente importante, uma vez que é a interface que vai interagir diretamente com o hospedeiro. São elas que influenciam os eventos celulares de interface iniciais. Estas vão determinar os tipos de moléculas adsorvidas na superfície dos materiais (LORCAN, *et al.*, 2006).

A exposição de qualquer material ao ambiente biológico resulta em rápida adsorção de proteína em sua superfície e são as propriedades de superfície do material que governam a composição, tipo, quantidade e conformação de proteínas adsorvidas, bem

como regulam fenômenos secundários de troca de proteínas e mediação celular de proteínas. Além disso, a composição e a conformação da camada de proteínas adsorvida é considerada fator determinante da natureza da interação célula material e, conseqüentemente do desempenho “*in vitro*” e “*in vivo*” do biomaterial (LORCAN, *et al.*, 2006).

As propriedades de superfície podem ser seletivamente modificadas para realçar o desempenho dos biomateriais, e os métodos de modificação empregados são classificados em três grupos principais: métodos biológicos, métodos físico-químicos e recobrimentos (ZHU, *et al.*, 2006).

Os métodos biológicos consistem imobilização de biomoléculas como proteínas, polissacarídeos, proteoglicanas e seus derivados (ZHU, *et al.*, 2006). Os métodos físico-químicos consistem imobilização de um ou mais grupos químicos na superfície do biomaterial. Já o método de recobrimento envolve a deposição de recobrimentos ou filmes finos os quais podem ser obtidos a partir de uma fase vapor via deposição física (PVD) ou via deposição química (CVD). Além disso, filmes e recobrimentos também podem ser obtidos através da imersão do material em uma solução contendo molécula de interesse (ZHU, *et al.*, 2006; NGUYEN *et al.*, 2004, GRINNELL, 1982).

## **2.6 Imobilização de Macromoléculas**

Vários autores têm publicado a respeito da forma como macromoléculas, em especial as proteínas, interagem com a superfície de biomateriais. Quando em contato com o organismo hospedeiro, o primeiro evento que ocorre na superfície dos biomateriais é a adsorção de proteína que acaba por desencadear uma série de reações biológicas. O filme de proteína formado na superfície do biomaterial age como mediador entre as células, o biomaterial e as vizinhanças (BARBUCCI, *et al.*, 2005).

O “sinal” das proteínas regula várias funções celulares como o crescimento, diferenciação, a secreção e a apoptose. É sabido que as proteínas bio-sinalizadoras interagem com o receptor cognato da superfície da célula para formar um complexo, e este complexo é agregado à superfície da célula antes de migrar para o interior da mesma. Sendo assim os biomateriais com moléculas bio-sinalizadoras imobilizadas em suas superfícies podem exercer papéis importantes na regulação de funções celulares (ITO, 1998).

O desenvolvimento de biomateriais para engenharia de tecidos tem focado o designer de materiais biomiméticos que sejam capazes de induzir respostas celulares específicas que direcionem a formação de um novo tecido mediado pelo reconhecimento biomolecular os quais podem ser manipulados para alterar os parâmetros do designer do material. O reconhecimento biomolecular pelas células tem sido alcançado através da modificação de superfície dos biomateriais, seja por processos físicos, químicos ou métodos que empregam moléculas bioativas como macromoléculas de matriz extracelular, como proteínas ou uma pequena seqüência de peptídeos derivados de proteínas que podem agir como receptores e promoverem interações específicas com as células. Os materiais

biomiméticos têm potencial para mimetizar vários fenômenos de matriz extracelular podendo prover condições biológicas para interagir com a matriz celular para promoção do crescimento de tecidos. Um dos caminhos para a obtenção de materiais biomiméticos é a imobilização de proteínas como a fibronectina, vitronectina e laminina, para a modificação de superfícies. Os biomateriais podem ser recobertos com essas proteínas para promoverem a adesão e a proliferação celular (SHIN, *et al.*, 2003).

Nas últimas décadas cientistas de várias áreas como, por exemplo, ciência de materiais, química, física, biologia e bioquímica, voltaram seus interesses para a funcionalização de materiais poliméricos para obter interações celulares específicas (HERSEL, *et al.*, 2003). No entanto, um dos grandes problemas dos biomateriais poliméricos consiste, em alguns casos, na interação inadequada entre células e polímeros. Uma das soluções propostas para esses problemas é indução da adesão de proteínas específicas e a modificação da superfície do material com a imobilização de macromoléculas que possam ser reconhecidas por células e que sejam capazes de motivar a adesão celular de forma a conseguir uma interação desejada entre célula e biomaterial.

### **2.6.1 Método Físico – *Layer-by-layer***

O método LBL o qual está baseado na fisiossorção alternada de polieletrólitos de cargas alternadas representa uma nova alternativa para o recobrimento de biomateriais. O procedimento para esta técnica é simples e pode ser adaptado para quase todos os tipos de superfície desde que cargas superficiais estejam presentes. A técnica aplica-se a qualquer

perfil superficial. Além dos polímeros sintéticos, polieletrólitos naturais também podem ser utilizados no método tais como, ácidos nucleicos, proteínas e polissacarídeos (ZHU, *et al.*, 2004).

Na técnica LBL o aparato experimental exigido é simples, o que aumenta o interesse comercial pela técnica LBL. Experimentalmente, o método de automontagem consiste em submergir o substrato num béquer contendo a solução do polycation ou do poliânion por um determinado período de tempo. Uma vez em contato com a solução de depósito, as moléculas carregadas dos poli-íons adsorvem-se na superfície do substrato por interação eletrostática. O substrato é, então, lavado em uma solução com pH próximo ao da solução na qual o substrato foi imerso para remover as moléculas que não foram adsorvidas, sendo em seguida seco ao ar ou jato de N<sub>2</sub>. O sistema substrato mais filme torna-se carregado eletrostaticamente, o que permite a adsorção de uma nova camada carregada com carga oposta através da imersão em outra solução. Após a adsorção desta segunda camada, o substrato é novamente lavado e seco. Estruturas de multicamadas podem ser construídas repetindo-se as etapas acima, de modo a se obter o número desejado de bicamadas, uma vez que, aparentemente, não há limitações na quantidade de camadas que podem ser depositadas (QUANG, *et al.*, 2003).

Para a imobilização de proteína, o substrato modificado é posto em contato com uma solução contendo a biomacromolécula. A interação se dá por interação entre as cargas, visto que, há sempre dois tipos de cargas nas moléculas de proteína. Naturalmente, se a proteína tem carga oposta à macromolécula adsorvida, a quantidade de espécies capturadas será maior. A ligação química cruzada das espécies capturadas pode ser aplicada para a estabilização da camada imobilizada (QUANG, *et al.*, 2003).

Os polipeptídios são polieletrólitos fracos. Quando polieletrólitos fracos são utilizados como constituintes de monocamadas a quantidade de cargas superficiais pode variar com o pH e ou concentração de íons pequenos; mudanças no pH e na força iônica da solução provocam mudanças na estrutura e na estabilidade do filme formado (KHARLAMPIEV, *et al.*, 2003).

WITTMER *et al.* (2007), investigaram a formação de multicamadas de filmes obtidos a partir de polieletrólitos de origem biológica, a adsorção de FN a esses filmes e a resposta de células à superfície do novo material em função do número de camadas de polieletrólito, da carga do último polieletrólito adicionado e da presença de FN. Segundo esta investigação, FN adsorve mais fortemente às superfícies positivamente carregadas e menos hidratadas. As células aderiram preferencialmente às superfícies contendo FN mostrando-se mais simétricas e mais estendidas. Sendo assim, biomateriais recobertos com FN são promissores para modular a adesão celular tendo potencial para utilização “*in vitro*” em engenharia de tecidos.

Na literatura existem exemplos de combinação de filmes automontados que combinam polissacarídeos e proteínas. Um exemplo é a modificação da superfície do titânio usando recobrimentos alternados de polissacarídeo e proteína. CAI *et al.* (2005) modificaram a superfície de titânio com a técnica LBL com o objetivo de promover crescimento de osteoblastos na superfície do material. Para tal a superfície do titânio foi modificada a partir da deposição de filmes de quitosana e gelatina. No trabalho desenvolvido por CAI *et al.* (2005), camadas de quitosana e gelatina foram imobilizadas na superfície dos filmes de titânio com o propósito de melhorara a habilidade de ligação entre o osso e o implante. Com o recobrimento, as propriedades de superfície dos filmes de

titânio foram melhoradas. A adesão de osteoblastos à superfície modificada foi maior do que na não modificada. Na superfície modificada as células (osteoblastos) espalharam e proliferaram mais do que na não modificada.

A técnica LBL permite a combinação de diferentes polieletrólitos. Na literatura são encontrados exemplos que combinam o polissacarídeo quitosana com polímeros variados. Dentre os trabalhos com este propósito pode-se citar o trabalho desenvolvido por YU, *et al.*, (2007) o qual utilizou a técnica LBL para modificar a superfície de membranas de poli(tetrametileno adipato - co - teraftalato) (PTAT). Quitosana foi utilizada como polieletrólito na construção dos filmes.

### **2.6.2 Modificação por funcionalização química**

A imobilização de proteína na superfície de materiais poliméricos requer, frequentemente a presença de grupos funcionais específicos como, por exemplo, grupos carboxil, amino e epóxi. A preparação da superfície de polímeros para a imobilização de moléculas biologicamente ativas envolve a ativação e/ ou a inserção destes grupos funcionais específicos. Esses grupos são tidos como agentes acopladores efetivos para a imobilização de proteínas (HOLLÄNDER, *et al.*, 2004).

Exemplos de ativação da superfície através de tratamentos químicos são encontrados na literatura. YANG *et al.* (2002), estudaram o efeito do tratamento de superfície na biocompatibilidade de filmes de PHB, PHBHHX e suas blendas utilizando como controle filmes de PLA. Para aumentar a biocompatibilidade destes poliésteres foram

utilizados lipase e hidróxido de sódio, respectivamente, a fim de promover a quebra das ligações éster destes polímeros. A hidrólise de poliésteres gera grupos que aumentam a hidrofilicidade e a capacidade das células aderirem à superfície do polímero além de fornecer subsídios para a imobilização de proteína. Os resultados obtidos por YANG *et al.* (2002), estão mostrados na Tabela 2.1.

**Tabela 2.1** - Efeito do tratamento da superfície de filmes de PHB na adesão celular (Yang *et al.* 2002).

Superfície de filmes de PHB	Células / $10^5 \text{ cm}^{-2}$
Não tratada	$0,01 \pm 0,001$
Tratada com lipolase	$1,75 \pm 0,02$
Tratada com NaOH	$0,25 \pm 0,01$

ROUXHET *et al.*, 1998, modificaram a superfície de filmes de PHB através da quebra de ligações ésteres promovidas pela ação de hidróxido de potássio (KOH) em meio alcoólico. A quebra das ligações éster promoveu um aumento da função -COOH na superfície do material. O número de grupos -COOH encontrados na superfície aumenta a medida que o tempo de hidrólise aumenta. A quantidade de grupos -COOH na superfície afeta diretamente a hidrofilicidade, o que pode ser observado na Tabela 2.2 através da variação do ângulo de contato.

*Tabela 2.2 - Evolução do ângulo de contato e Número de grupos – COOH terminais na superfície na superfície de filmes de PHB tratados com KOH em função do tempo de hidrólise.*

<b>Superfície de Filmes de PHB</b>	<b>Ângulo de contato (<math>\theta</math>)</b>	<b>Número de grupos – COOH terminais na superfície (pmoles.cm<sup>-2</sup>)</b>
Não hidrolisado	55	0
30 minutos de hidrólise	68,5	1700
120 minutos de hidrólise	72,5	2200
240 minutos de hidrólise	74	2400

As propriedades específicas dos amino grupos fazem com que estes sejam excelentes imobilizadores de proteína. Em contraste com a maioria dos outros grupos funcionais, a protonação de amino grupos dá origem a cargas positivas na superfície dos materiais poliméricos funcionalizados o que, quando em meio aquoso e em pH fisiológico, faz com que a superfície funcionalizada atraia biomoléculas negativamente carregadas. Além disso, devido a sua boa reatividade química, amino grupos são frequentemente utilizados em bioquímica para acoplar proteínas covalentemente em meio aquoso. (MEYER, *et al.*, 2003). STEFFENS, *et al.* (2002), avaliaram a imobilização de proteína na superfície de poli(D – ácido lático) graftizado com ácido poli-acrílico. Ligações covalentes

foram realizadas entre os amino grupos da proteína e os grupamentos carboxil do polímero funcionalizado.

Como dito anteriormente, em condições alcalinas os grupos ésteres podem ser hidrolisados a ácidos carboxílicos. Com isso, é possível que amino grupos sejam introduzidos na superfície do poliéster quando este reage com compostos aminados. Quando poliésteres reagem com uma diamina ocorre reação entre um grupo amino e o grupo  $-COO-$  para formar a ligação covalente  $-CONH-$ , ao passo que o outro amino grupo fica livre. À reação entre compostos aminados e poliésteres dá-se o nome de aminólise. Durante a aminólise grupos hidroxil terminais de cadeia também estão presentes na superfície do poliéster (oriundos da hidrólise). Algumas vantagens são esperadas em engenharia de tecidos através da introdução desses amino grupos na superfície de materiais poliméricos, dentre elas destacam-se (ZHU, *et al.*, 2002):

- (i) Não são tóxicos a tecidos ou células;
- (ii) Diminui a hidrofobicidade;
- (iii) Neutraliza a geração de ácidos;
- (iv) Promove sítios ativos para a imobilização de biomoléculas como colágeno, gelatina, ou peptídeos RGD podem ser também imobilizados.
- (v) É aplicável a suportes porosos constituídos de poliéster.

Visando mimetizar a superfície de suportes porosos para a regeneração de tecido epitelial, ZHU, *et al.* (2007), graftizaram a superfície do suporte de PLLC com a proteína adesiva, fibronectina. A imobilização de FN foi realizada em duas etapas: a primeira foi a

aminólise do suporte e a segunda foi o acoplamento da proteína ao suporte via glutaraldeído. ZHU, *et al.* (2007), avaliaram o efeito da aminólise nas propriedades mecânicas do suporte de PLLC. Análise de tensão *versus* deformação de suportes de PLLC mostraram que, após a aminólise, o suporte tornou-se mais rígido, ou seja, para atingir uma deformação igual a do suporte não aminolisado maior tensão teve que ser aplicada, como pode ser observado na Tabela 2.3. Células epiteliais foram adicionadas à superfície do suporte contendo a proteína. Segundo ZHU, *et al.* (2007), a presença de FN na superfície do suporte porosos de PLLC acelerou a regeneração do tecido epitelial.

**Tabela 2.3** – Dados de tensão x deformação de suportes de PLLC aminolisados ou não  
(ZHU, *et al.*, 2007)

Deformação (%)	Tensão (MPa)	
	Aminolisado	Não aminolisado
20	1,6	1
40	3,0	1,9
60	4,1	2,9
80	5,1	3,0

ZHANG *et al.* (2006), visando manipular a resposta celular à superfície de filmes de PET, imobilizou FN, covalentemente, à superfície destes. Para a imobilização de FN a superfície dos filmes de PET foram aminolisadas utilizando para tal hexanodiamina. A superfície aminolisada foi tratada com glutaraldeído e, em seguida, FN foi covalentemente imobilizada na superfície dos filmes. A Tabela 2.4 mostra o efeito da modificação de superfície no ângulo de contato.

Tabela 2.4 - ângulo de contato das superfícies de filmes de PET não modificados, aminolisado, com FN imobilizada.

Filmes de PET	Ângulo de contato ( $\theta$ )
Não modificado	74
Aminolisado	64
Aminolisado + Fibronectina	56

ZHU, *et al.* (2002), modificou quimicamente a superfície de suportes policaprolactana (PCL) via aminólise para imobilizar biomacromoléculas com propósito de promover a citocompatibilidade de células endoteliais humanas. Amino grupos foram introduzidas nas membranas de PCL. Segundo ZHU *et al.* (2002), a quantidade de grupamentos amino incorporados à membrana é função do tempo de reação. A presença de grupamentos amino na membrana de PCL não só tornou o material mais hidrofílico como funcionou como sítios ativos para a imobilização de proteína. A imobilização de biomacromoléculas nas membranas de PCL teve efeito positivo no aumento da citocompatibilidade da membrana. Com a imobilização de biomacromoléculas houve um aumento da taxa de proliferação celular.

A imobilização covalente de proteínas em superfícies de polímeros é geralmente considerada como uma estratégia promissora para realçar as propriedades de compatibilidade do sangue e tecidos a biomateriais. Vários procedimentos para ligar as proteínas covalentemente à superfície dos biomateriais tem sido descritos (MEYER, *et al.*, 2003). Alguns procedimentos visam imobilizar camadas monomoleculares de proteínas e

peptídeos. Outros procedimentos tentam combinar e ou incorporar proteínas funcionais a polímeros biodegradáveis visando à liberação de proteínas funcionais ao longo da degradação (STEFFENS, *et al.*, 2002).

## **2.7 – Fibronectina**

Fibronectina denota um conjunto de isoformas de uma glicoproteína dimérica, com pesos moleculares que variam de 440.000 a 500.000 Da. Encontra-se fibronectina em todos os organismos vertebrados sob duas formas fundamentais: no plasma sanguíneo e em outros fluidos corporais sob uma forma solúvel e compoendo a matriz extracelular de diversos tecidos sob uma forma insolúvel. A fibronectina é reconhecidamente uma molécula com funções de adesão, migração e diferenciação celular, bem como organização tecidual (MENEZES, 2003).

### **2.7.1 - Interação Osteoblastos/ Fibronectina**

“*In vitro*”, osteoblastos e seus precursores produzem fibronectina e interagem com ela pela formação de adesões focais, subseqüentemente formando uma matriz da glicoproteína tal qual um fibroblasto. In vivo, a análise ultra-estrutural de ossos corticais revela uma concentração de fibronectina em matrizes mineralizadas maduras e é expressa inclusive pela indução óssea ectópica (MENEZES, 2003).

## 2.8 - Quitosana

A quitosana,  $\beta(1-4)$ -2-amino-2-deoxi-D-glicose, é o principal derivado da quitina, e é obtida a partir da desacetilação desta pelo processo de hidrólise básica (JUSTI, *et al.*, 2004). A quantidade de glucosamina remanescente na quitosana é chamada de grau de desacetilação (EUGENE & LEE, 2003). A quitosana tem, geralmente, três grupos funcionais reativos, um amino grupo e grupos hidroxil primários e secundários (MADIHALLY & MATTHEW, 1999). É o único polímero pseudonatural de caráter catiônico e por esta razão interage com espécies aniônicas como as glicosaminoglicânicas (GAG) e proteoglicanas e com outras espécies negativamente carregadas presentes no sangue.

A quitosana tem se destacado como um polissacarídeo promissor em engenharia de tecidos, pois é: biocompatível, biodegradável, atóxica, bactericida, fungicida, fisiologicamente inerte; possui afinidade com proteínas e atividade antitumoral. (NISHIMURA *et al.*, 1984; TANIGAWA *et al.*, 1992; OKAMOTO *et al.*, 1993; KHNOR & LIM, 1993; MORI *et al.*, 1997; TOKURA *et al.*, 1997; SINGLA & CHAWLA, 2001).

Quitosana tem sido utilizada na modificação de superfície de suportes protéticos por ser capaz de induzir a adesão de osteoblastos (LEE *et al.*, 2002). BUMGARDNER *et al.* (2003) mostraram que a superfície de titânio recoberta com quitosana via modificação química aumentou a adesão e a proliferação de osteoblastos.

Segundo a literatura, quitosana já foi combinada a outros materiais poliméricos para melhorar a adesão de osteoblastos. ZHANG *et al.* (2007), combinaram quitosana e PLLA para controlar a taxa de degradação e melhorar a biocompatibilidade do PLLA a osteoblastos. BHATTARAI *et al.* (2005), avaliaram matrizes de poli(óxido de etileno) (PEO) contendo 90 % de quitosana frente a osteoblastos humanos. Foi observado que o material contendo 90 % de quitosana promoveu a adesão de osteoblastos e de condrócitos humanos e que durante o período de estudo, as células mantiveram suas características morfológicas.

A literatura relata que peptídeos foram imobilizados na superfície de suportes porosos constituídos de quitosana e PLA. Os resultados das culturas demonstraram que a imobilização de peptídeos pôde, efetivamente, melhorar a adesão e a mineralização de osteoblastos no suporte poroso. Os resultados deste estudo indicam que, com a imobilização de peptídeos específicos para osteoblastos, é possível obter suportes porosos contendo osteoblastos que terão potencial para serem utilizados na construção de tecidos ósseos (HO *et al.*, 2006).

CAI *et al.* (2007), modificaram a superfície de suportes porosos de poli(D-L, ácido láctico) (PDLLA) recobrando-a com quitosana. Ensaio mostraram que, os suportes recobertos com quitosana apresentaram melhor biocompatibilidade e, maior potencial para a formação de osso.

# CAPÍTULO III

---

## METODOLOGIA

### 3.1 – Produtos químicos utilizados

Os produtos químicos utilizados na confecção dos suportes e nos processos de modificação e caracterização de superfície foram:

⇒ **Produção de suportes porosos:**

- Polihidroxibutirato em forma de pó branco, com peso molecular (Mw) de 524.000 Da e polidispersão igual a 8,6. Fornecido pela PHB Industrial S/A;
- Clorofórmio ( $\text{CHCl}_3$ ) produzido pela Vetec Química Fina Ltda, grau de pureza P.A.;
- Cloreto de sódio ( $\text{NaCl}$ ) produzido pela Vetec Química Fina Ltda, grau de pureza P.A.;

⇒ **Modificações de superfície:**

- Etilenodiamina produzido pela Vetec Química Fina Ltda, grau de pureza P.A.;
- Quitosana, grau de acetilação 22%, peso molecular Mn igual a 108.700 Da e polidispersão igual a 6,2. Produzida pela Galena Química e Farmacêutica Ltda;

- Ácido clorídrico produzido pela Vetec Química Fina Ltda, grau de pureza P.A.;
- Fibronectina sérica humana produzida pela Sigma Ltda;
- Tampão acetato de sódio produzido pela Reagen Ltda; grau de pureza P.A.
- Ácido acético glacial produzido pela Merck Ltda, grau de 99,7%;
- Cloreto de sódio produzido pela Reagen; grau de pureza 99 %;
- Tampão glicina produzido pela Pharmacia Biotech AB;
- Hidróxido de sódio produzido pela Vetec Química fina Ltda, grau de pureza P.A.

⇒ **Biodegradação- Solução Tampão (PBS):**

- Fosfato de sódio monobásico ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) – Vetec Química fina Ltda, grau de pureza P.A.
- Fosfato de sódio dibásico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) Vetec Química fina Ltda, grau de pureza P.A.

⇒ **Bioatividade:**

- Cloreto de sódio produzido pela Vetec Química Fina Ltda, grau de pureza 99,5 %;
- Bicarbonato de sódio produzido pela Vetec Química Fina Ltda grau de pureza 99,5 %;
- Cloreto de potássio produzido pela produzido pela Vetec Química Fina Ltda grau de pureza 99,5 %

- Bifosfato de potássio tri-hidratado produzido pela VETEC Química Fina Ltda grau de pureza 99, %;
- Cloreto de magnésio produzido pela VETEC Química Fina Ltda grau de pureza 98,0 %;
- Ácido clorídrico produzido pela VETEC Química Fina Ltda;
- Cloreto de cálcio produzido pela VETEC Química Fina Ltda grau de pureza 95,0 %;

### 3.2 - Equipamentos utilizados

Abaixo se encontram listados os equipamentos utilizados:

- Balança analítica <sup>1</sup> (QUMIS<sup>®</sup> – Q500L210C);
- Bomba de Vácuo<sup>1</sup> (QUMIS<sup>®</sup> – Q355D)
- Condutivímetro <sup>1</sup> (QUMIS<sup>®</sup> – Q795M2)
- Contador de cintilação líquida, (1214 Rackbeta Liquid Scintillation Counter - LKB Wallac)<sup>2</sup>.
- Espectrofluorímetro de fluorescência (F-4500 Hitachi) <sup>2</sup>.
- Espectrofotômetro de Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) (Perkin-Elmer, modelo 1720- X) <sup>3</sup>.
- Goniômetro (Ramé – Hart Instruments Co – Drop Image Advanced)<sup>1</sup>
- Medidor de pH (Quimis - Q400MT) <sup>1</sup>.

- Microscópio Eletrônico de Varredura (JEOL JSM, modelo 6460 LV)<sup>1</sup>.
- Peneirador (Gilson Perfomer III modelo SS3<sup>1</sup>).
- Peneiras granulométricas (Granutest, faixa 75-125 µm<sup>1</sup>).
- Placa aquecedora e agitadora<sup>1</sup> QUMIS<sup>®</sup>.

Os equipamentos acima citados pertencem ao:

<sup>1</sup> COPPE/PEMM/ UFRJ - Programa de Engenharia Metalúrgica e de Materiais – Universidade Federal do Rio de Janeiro.

<sup>2</sup> CCS/ BIOFIS/ UFRJ – Centro de Ciências da Saúde - Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho – Universidade Federal do Rio de Janeiro.

<sup>3</sup> IMA/ UFRJ – Instituto de Macromoléculas – Universidade Federal do Rio de Janeiro.

### **3.3 - Produção de Suportes Porosos de Polihidroxibutirato**

#### **3.3.1 - Preparo da solução de PHB**

A um balão de fundo chato de capacidade igual a 250 mL foi adicionado 7,0 g PHB. O preparo da solução se dividiu em duas etapas:

- (i) inchamento do polímero sob agitação magnética a temperatura ambiente por 2 h;

- (ii) dissolução propriamente dita através do aquecimento do sistema sob agitação e refluxo a 65°C por um período de 2 horas.

A solução resultante, depois de atingir a temperatura ambiente foi filtrada a vácuo em funil de vidro. Este procedimento foi baseado na metodologia descrita por Sader, (2003).

### 3.3.2 - Determinação da concentração e da densidade da solução de PHB

Determinou-se a concentração da solução de PHB através do peso seco transferindo-se 1 mL da solução para recipientes metálicos previamente tarados. Os recipientes contendo a solução foram aquecidos em estufa a temperatura de 105 °C para remoção do solvente residual e foram pesados a cada 2 horas até que a massa do conjunto, recipiente mais amostra, fosse constante obtendo-se assim a concentração da solução em g/mL. A concentração em %(p/v) da solução de PHB foi obtida pela Equação (1).

Equação (1):

$$C_{(\%p/v)} = \frac{(M_f - M_0) \times 100}{V}$$

$C_{(\%p/v)}$  = concentração

$M_f$  = massa do recipiente mais a amostra

$M_0$  = massa do recipiente

$V$  = volume de amostra

A determinação da densidade foi realizada pesando-se 1mL de solução, obtendo-se dessa forma o valor da densidade em g/mL.

### 3.3.3 - Classificação granulométrica e secagem do cloreto de sódio

Para efetuar a análise granulométrica, as peneiras foram empilhadas, de modo que, sobre uma peneira estivesse outra de abertura maior. Sob a peneira do fundo foi inserida uma bandeja cega. Cloreto de sódio (NaCl) macerado em gral foi adicionado à peneira do topo. O conjunto de peneiras foi fixado ao peneirador Gilson Perfomer III, modelo SS3, e em seguida agitado por 20 minutos (FOUST *et al.*, 1982). Ao término do processo de separação recolheu-se o NaCl na faixa de 75 a 125  $\mu\text{m}$ . O sal recolhido foi secado a 105° C em estufa por 12 horas

#### **3.3.4 - Confeção dos suportes porosos de PHB utilizando a técnica de lixiviação de sal**

A um molde cilíndrico de vidro foi adicionado 0,3 g de cloreto de sódio (faixa granulométrica de 75 a 125  $\mu\text{m}$ ) devidamente seco. Ao molde contendo o sal foram adicionados 2 mL de solução de PHB a 10 % (p/v). A mistura heterogênea sal / solução de PHB foi agitada até não mais ser observado depósito de sal no fundo do molde. Os moldes contendo a mistura sal mais solução foram postos para secar em dessecador. Os suportes secaram por 48 horas e em seguida foram imersos em água destilada por 48 h para a remoção do sal (método de lixiviação). As amostras resultantes foram secas à temperatura ambiente em dessecador sendo o período total de secagem igual a 72 h.

A quantidade de agente porogênico utilizada é o que determina a porosidade do suporte poroso. Neste trabalho, a quantidade de agente porogênico utilizada foi constante e a proporção adotada foi igual a 60 % (p/p). A escolha desta proporção foi baseada na literatura. SADER (2003) produziu suportes de PHB utilizando a técnica de lixiviação de

sal e obteve bons resultados para a proporção de 60% no que se refere a adesão de osteoblastos.

### **3.3.5 – Acompanhamento da remoção de sal por condutivimetria - construção da curva-padrão de condutividade do cloreto de sódio**

O cloreto de sódio é um composto iônico. Compostos iônicos conduzem eletricidade quando fundidos ou em solução. A condução deve-se à migração dos íons para os respectivos eletrodos sob a ação de um potencial elétrico. Portanto, a determinação da condutividade elétrica é uma forma indireta de inferir a quantidade de sal presente em uma solução. Quanto maior a condutividade, maior a concentração de sal (LEE, 2003).

A curva-padrão de condutividade para o cloreto de sódio foi construída com a finalidade de acompanhar quantitativamente o processo de remoção do sal dos suportes de PHB. Para tal, tomou-se como base de cálculo a concentração máxima de sal (em g/mL) que seria obtida caso todo o sal de uma determinada quantidade de suportes fosse removido em um volume de 100 mL de água destilada. Sendo a massa total do suporte igual a 0,5 g e a quantidade de sal presente na amostra correspondente a 60% (p/p), para 5 suportes imersos em 100 mL, estima-se que a massa máxima de sal será de 1,5 g. Ou seja, a concentração máxima de sal para um processo de lixiviação com rendimento de 100% seria 0,015 g/mL. Sendo assim, foram preparadas soluções de cloreto de sódio em concentrações variando de 0 a 0,02 g/mL. Os valores de condutividade das soluções resultantes foram obtidos utilizando o condutivímetro (Qumis® – Modelo Q795M2) a 24,5°C. O teor de sal removido foi obtido confrontando-se os valores de condutividade obtidos para a água de

lavagem dos suportes porosos com os dados da curva-padrão. Os ensaios foram realizados em triplicada e para a construção da curva padrão foram utilizados valores médios de condutividade.

### **3.4 – Determinação da densidade de suportes porosos de PHB**

O princípio de Arquimedes enuncia-se da seguinte forma: "Todo corpo mergulhado num fluido sofre, por parte do fluido, uma força vertical para cima, cuja intensidade é igual ao peso do fluido deslocado pelo corpo. Num corpo que se encontra imerso em um líquido em repouso, atuam duas forças, ambas com mesmo centro de ação, são elas: a força peso (devido à interação com o campo gravitacional terrestre) e a força de impulsão (devido a sua interação com o líquido)" (CARVALHO, 1997).

A balança hidrostática é uma balança cujo funcionamento se baseia no princípio de Arquimedes e é utilizada para a determinação de densidades de sólidos e líquidos. A densidade dos suportes porosos foi determinada utilizando-se a balança de Arquimedes. Os suportes porosos foram pesados a seco em balança analítica e, com a balança de Arquimedes, foram obtidos os valores de massa aparente para os suportes porosos. Com os valores de massa e massa aparente dos suportes porosos de PHB calculou-se a densidade média a partir da Equação (2). Na determinação da densidade média foram utilizados dez suportes porosos.

Equação (2):

$$\rho_{\text{sup}} = \frac{\text{Pol}_{\text{seco}} \times \rho_{\text{água}}}{\text{Pol}_{\text{seco}} - \text{Pol}_{\text{úmido}}}$$

$\text{Pol}_{\text{seco}}$  = massa do polímero seco;

$\text{Pol}_{\text{úmido}}$  = massa do polímero úmido;

$\rho_{\text{sup}}$  = densidade do suporte;

$\rho_{\text{água}}$  = densidade da água.

### 3.5 - Volume de poros e porosidade dos suportes porosos de PHB

#### 3.5.1 – Volume de poros e porosidade

O volume de poros foi obtido de forma indireta verificando-se o volume de água absorvido pelo suporte. O controle do volume de água absorvida foi realizado correlacionando-se a densidade da água a 25 °C e a massa máxima de água absorvida por um suporte poroso. Os suportes porosos foram imersos em água destilada e pesados periodicamente até massa constante. A massa total de água absorvida foi obtida pela diferença entre os valores de massa do suporte poroso seco (massa inicial) e a massa do suporte poroso contendo água (massa final). O volume de água absorvida foi obtido pela Equação (3). O volume de poros do suporte corresponde ao volume de água absorvida, que por sua vez está relacionado com a massa através da densidade à temperatura de execução do experimento (26,5°C). Para a obtenção do volume médio de poros foram utilizados dez suportes.

Equação (3):

$$d = \frac{m}{V}$$

d = densidade;

m = massa;

V = volume.

A porosidade é a relação entre o volume de vazios e o volume real do suporte poroso (KARAGEORGIU *et al.*, 2005). A porosidade dos suportes porosos de PHB foi obtida pela Equação (4).

Equação (4)

$$P = \frac{V_{\text{poros}} \times 100}{V}$$

$V_{\text{poros}}$  = volume de poros com base no volume de água absorvido;

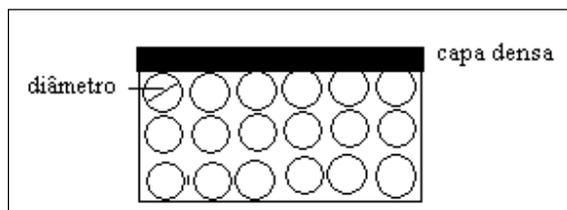
V = volume do suporte poroso obtido pela Equação (3)\*

*\*Volume do suporte obtido utilizando a densidade do suporte obtida pela Equação (2) e a massa do suporte poroso seco.*

### 3.6 - Determinação da espessura e do tamanho de poros dos suportes porosos de PHB

A espessura dos suportes porosos de PHB foi obtida utilizando micrômetro Mitutoyo nº 293-265. Para tal, foram utilizados 10 suportes e em cada um deles realizou-se três medidas em diferentes regiões. O tamanho de poros e a espessura da capa densa dos suportes porosos de PHB foram mensurados com base nas micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura. A figura 3.1 mostra a representação esquemática do

suporte poroso de PHB e as regiões mensuradas. Para obtenção dos valores médios de espessura da capa densa e do tamanho de poros foram analisadas três imagens.



*Figura 3.1 – Representação esquemática do suporte poroso.*

### **3.7 – Modificação de superfície de suportes porosos de PHB**

#### **3.7.1 – Aminólise**

Os éteres, geralmente, sofrem reação de adição-eliminação nucleofílica nos átomos de carbono acílico quando são tratados com amônia ou com aminas primárias ou secundárias. Com o objetivo de funcionalizar a superfície dos suportes porosos de PHB para criar sítios para a adesão de fibronectina os suportes porosos foram imersos em solução aquosa de etilendiamina 0,1 N por 45, 90 e 120 min a 50°C. Após o tratamento, os suportes porosos foram lavados com água destilada a temperatura ambiente e, em seguida, foram imersos em água destilada gelada, por 24 horas, para remover o excesso de etilendiamina (THIRÉ, *et al.*, 2007).

#### **3.7.2 - Modificação com Quitosana**

O tratamento com quitosana visa obter filmes automontados alternados, sobre o suporte poroso de PHB para posterior imobilização de fibronectina. Para tal os suportes porosos foram imersos em solução aquosa de quitosana 0,2 mg/mL a pH 3,5 por períodos de 3, 12 e 24 horas a temperatura ambiente. Em seguida foram lavados e imersos em água destilada por um período de 24 horas.

### **3.8 Imobilização de Fibronectina (FN)**

A principal estratégia biomimética para modificar superfícies em engenharia de tecidos consiste na imobilização de peptídeos biologicamente ativos (normalmente contendo peptídeos RGD) na superfície do material (Caia, 2005). Para biomimetizar a superfície de suportes porosos de PHB, fibronectina sérica humana foi adicionada à superfície de suportes porosos não modificados e de suportes porosos modificados com etilenodiamina ou com quitosana.

A solução estoque de fibronectina sérica humana foi diluída para concentração final de  $10 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ , em pH 4,5 utilizando tampão acetato de sódio 20 mM ajustado com ácido acético glacial para obter pH 4,5. À superfície dos suportes modificados ou não, foi adicionado solução de FN. A solução foi mantida em contato com a superfície dos suportes por 1 h a temperatura ambiente. Os suportes foram, então, lavados em meio de cultivo modificado de Dulbecco (DMEM) sem soro (MENEZES, 2004).

### **3.9 - Dosagem de Proteína**

Suportes de PHB contendo FN adsorvida foram cuidadosamente lavados com meio modificado de Dulbecco (DMEM) sem soro e incubados em solução de 0.5% SDS (dodecil sulfato de sódio) feito em PBS (solução salina tamponada com fosfato) (0,145 M NaCl tamponado com 0,01M fosfato, pH 7,2) por até 30 minutos. Em seguida, a quantidade de proteína associada a superfícies de PHB, solubilizada por ação do detergente SDS, foi avaliada por espectrofotometria ( $\lambda = 550 \text{ nm}$ ) Os suportes de PHB sem FN foram utilizados como controle (BRADFORD, 1976).

### **3.10 - Associação de células HOB à superfície de suportes porosos de PHB**

A cultura de células foi realizada no Laboratório de Laboratório de Biologia da Superfície Celular. (CCS), de acordo com o procedimento descrito por Menezes, (2003). As células foram pré-incubadas em meio de cultura contendo 3H-timidina. Após incorporação da timidina às células e confluência da cultura, as células foram descoladas das garrafas de cultivo, lavadas duas vezes com solução de NaCl (0,145 M tamponada com fosfato (PBS) 0,01M, pH 7,0, estéril) e contadas em câmara de Neubauer. Aos suportes recobertos ou não com FN foram adicionadas  $1 \times 10^6$  células.ml<sup>-1</sup> (cerca de 2 ml por suporte). Após 120 minutos de interação, as células não associadas aos suportes foram recolhidas e os suportes contendo células associadas foram lavados com PBS. Em seguida, solução contendo o detergente SDS foi adicionada às células associadas aos suportes e àquelas não associadas previamente recolhidas. Cada suporte foi levado a um aparelho de cintilação líquida (1214 Rackbeta Liquid Scintillation Counter, LKB Wallac) e o resultado obtido em cpm

(contagem por minuto) foi convertido em porcentagem, segundo a Equação (4) (SILVA FILHO, *et al.*, 2004).

Equação (4):

$$P_{cas} = \frac{Cpm_{tc} - Cpm_{as}}{Cpm_{tc}} \times 100$$

Cpmtc = cpm obtida de todas as células;

Cpmas = cpm obtida das células associadas aos suportes;

Pcas = porcentagem de células associadas aos suportes

### **3.11 – Caracterização da superfície de suportes porosos de PHB**

#### **3.11.1 – Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectrometria por dispersão de energia de raios X (EDS).**

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) é utilizada, rotineiramente, para a análise micro-estrutural de materiais sólidos. Com o MEV, há a possibilidade de se obter elevada profundidade de foco, o que implica na obtenção de imagens com aparência tridimensional. Além disso, pode-se combinar, quando possível, a análise micro-estrutural com a micro-análise química.

Visando a compreensão da morfologia e da composição química, a superfície e a seção transversal dos suportes porosos de PHB modificados ou não foram observadas em microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM (modelo 6460 LV). Para a análise da seção

transversal, os suportes porosos foram imersos em nitrogênio líquido e fraturados. As amostras foram recobertas com uma fina camada de ouro obtida por pulverização a vácuo (20 mA por 2 minutos) e observadas a 15 KV, sendo os campos de interesse documentados por micrografias. A micro-análise elementar da superfície dos suportes porosos de PHB foi realizada por espectrometria por dispersão de energia de raios X (*energy dispersive X-Ray spectrometer- EDS*).

### **3.11.2 Microscopia de força atômica (AFM)**

O princípio de funcionamento do AFM é baseado na varredura da superfície da amostra por uma ponteira de formato piramidal de comprimento na ordem de alguns micra (100 a 200  $\mu\text{m}$ ) e com diâmetro na ordem de nanômetros, integrada em uma viga flexível. A sonda de um AFM exerce sobre a amostra uma força da ordem das forças interatômicas. Quando a superfície de uma amostra é varrida por uma sonda, a sonda pode se afastar ou se aproximar da mesma. Diversas forças contribuem para que isto aconteça e a principal é a força de van der Waals. As diferenças de deflexão são captadas por um detector, armazenadas e processadas por um computador, que as transformam em imagens topográficas da superfície bi e tridimensionais. A técnica de AFM pode ser operada em três modos diferentes: contato, não-contato e contato intermitente. No modo contato, a viga é mantida a poucos angstrom da superfície da amostra e a força interatômica entre a ponta e a amostra é repulsiva. Neste modo de operação, a ponta faz um leve "contato físico" com a amostra produzindo imagens com alta resolução. No modo de não-contato, a viga é mantida a alguns angstrom da superfície da amostra e a força interatômica entre a ponta e a amostra

é atrativa. Neste caso a ponta oscila em alta frequência (100 kHz a 1 MHz), a poucos nanômetros acima da superfície e a força total entre a ponta e a amostra é muito baixa, geralmente em torno de  $10^{-12}$  N. O modo contato intermitente é similar ao não-contato, exceto pelo fato de que a ponta vibrante fica mais próxima da amostra, de forma que tenha um contato intermitente e é utilizado para contornar as limitações impostas pelo modo contato. A comparação das imagens nos modos contato e intermitente mostra que as superfícies são menos modificadas no modo intermitente (HUMPHRIS, *et al.*, 2005).

As análises de microscopia de força atômica foram conduzidas no microscópio de força atômica Topometrix Acurrex-IIL. A morfologia dos suportes porosos de PHB antes e após a modificação foi analisada em modo de contato intermitente utilizando agulhas de nitreto de silício (MikroMasch™ NSC16) montadas em uma haste com constante de mola igual a 40 N/m e frequência de ressonância de 170 kHz. Os suportes porosos foram fixados em suporte de vidro com fita dupla face e as imagens de AFM foram obtidas no ar. A determinação da rugosidade média quadrática (RMS) foi feita com base em imagens de topografia de 20  $\mu\text{m}$  x 20  $\mu\text{m}$ .

### **3.11.3 – Espectrometria de infra-vermelho com transformada de Fourier FTIR**

A espectroscopia de infravermelho (espectroscopia IV) é um tipo de espectroscopia de absorção a qual utiliza a região do infravermelho do espectro eletromagnético. Como as demais técnicas espectroscópicas, ela pode ser usada para identificar um composto ou investigar a composição de uma amostra. Basicamente, o que

se mede nesta análise é a fração da energia transmitida ou absorvida em relação à incidente em determinado comprimento de onda ou número de onda. A espectroscopia no infravermelho baseia-se no fato de que as ligações químicas das substâncias possuem frequências de vibração específicas, as quais correspondem a níveis de energia da molécula (chamados, nesse caso, de níveis vibracionais). Tais frequências dependem da forma da superfície de energia potencial da molécula, da geometria molecular, das massas dos átomos e, eventualmente, do acoplamento vibrônico (SILVERSTEIN *et al.*, 1991).

Para investigar as possíveis modificações qualitativas causadas pelo tratamento da superfície dos suportes porosos com etilenodiamina e com quitosana, as amostras foram analisadas em espectrômetro com transformada de Fourier na região do infravermelho (FTIR), Perkin-Elmer 1720X. A análise dos suportes porosos de PHB modificados ou não foram realizadas sob as seguintes condições operacionais:

- resolução do equipamento:  $20\text{ cm}^{-1}$
- número de varreduras: 20;
- faixa de número de onda:  $4000 - 400\text{ cm}^{-1}$

A interpretação dos espectros foi feita com base nas tabelas apresentadas por SILVERSTEIN *et al.* (1991), onde estão registradas as frequências de absorção no infravermelho características de vários grupos orgânicos.

#### **3.11.4 - Ângulo de contato – energia de superfície de suportes porosos de PHB**

A interação entre uma superfície e um determinado líquido pode ser estudada através da medida do ângulo de contato ( $\theta$ ). Este é definido como o ângulo entre um plano tangente a uma gota do líquido e um plano contendo a superfície onde o líquido se encontra depositado. A gota está sujeita a um equilíbrio termodinâmico envolvendo as três fases (vapor-sólido-líquido) e sua forma depende das energias envolvidas no sistema. A equação de Young (Equação (5)) relaciona essas energias (CASTELLAN, 1986).

Equação (5):

$$\sigma_{LV}\cos\theta = \sigma_{SV} - \sigma_{SL}$$

$\sigma_{LV}$  = tensão líquido-vapor;  
 $\sigma_{SV}$  = tensão superfície sólido-vapor;  
 $\sigma_{SL}$  = tensão da superfície sólido-líquido.

Ângulos de contato de líquidos em superfícies poliméricas são utilizados para determinar a molhabilidade desses sólidos a partir do cálculo de suas tensões superficiais sólido-vapor. Apesar da teoria ser baseada no equilíbrio de uma gota simétrica em uma superfície plana, horizontal, suave, homogênea e sólida, na prática é geralmente encontrada toda uma faixa experimentalmente acessível de ângulos de contato causando molhadura ou ângulo de contato de histerese (diferença entre o ângulo inicial e final no tempo). A razão é que ângulos de contato de superfícies poliméricas não são influenciados apenas pelas tensões superficiais de acordo com a equação de Young, mas também por outros fenômenos como rugosidade, heterogeneidade química, orientação molecular e solubilidade parcial do polímero (no caso de misturas poliméricas); e todos esses efeitos devem ser levados em consideração quando a medida de ângulo de contato for realizada (VAN OSS, 1986).

O ângulo de contato é importante na determinação da tensão superficial através da equação de Young Laplace. Quanto menor o ângulo ( $\theta$ ) entre o líquido e o sólido, maior será o espalhamento do líquido sobre a superfície do sólido. Quando o líquido utilizado é a água, a medida do ângulo de contato é uma medida de hidrofobicidade do material. O ângulo de contato é específico para cada sistema e depende das interações entre as três interfaces (vapor/líquido - vapor/sólido - sólido/líquido) (CASTELLAN,1986).

Foram realizadas medidas de ângulo contato das superfícies de suportes porosos pelo método da gota séssil utilizando Goniômetro (Ramé – Hart Instruments Co – Drop Image Advanced). Para análise da hidrofiliicidade dos suportes modificados ou não, gotas de água foram adicionadas às superfícies e os respectivos ângulos de contato foram mensurados. Com auxílio do software acoplado ao goniômetro foram obtidos os valores de energia de superfície a dois líquidos (água e formamida). As medidas de ângulo de contato foram realizadas em triplicata e a cada amostra foram adicionadas 3 gotas em diferentes regiões.

### **3.12 – Estudo da degradação “*in vitro*” da superfície de suportes porosos de PHB**

Para o ensaio de degradação “*in vitro*”, os suportes porosos de PHB foram colocados em tubos fechados, com 20 mL de solução tampão fosfato salino pH 7,4 em estufa a 37 °C. A solução PBS foi trocada periodicamente, os suportes porosos foram

retirados do banho a cada mês até um máximo de três meses de ensaio de degradação. Os suportes porosos retirados do banho foram lavados com água milli-Q e com etanol PA, e secas em estufa a vácuo a 60°C por 8 horas. As amostras degradadas e secas foram caracterizadas por microscopia eletrônica de varredura (VANIN, 2004).

### **3.13 – Estudo da bioatividade “*in vitro*” da superfície de suportes porosos de PHB**

O teste de bioatividade consiste na avaliação da capacidade de o material em formar fosfato de cálcio sobre a sua superfície. O teste de bioatividade foi conduzido “*in vitro*” utilizando uma solução acelular simuladora do fluido corpóreo, *sorological body fluid* (SBF) a 37 °C em pH 7,4. A solução SBF foi preparada de acordo com a metodologia descrita por KOKUBO *et al.* (1990). Na Tabela 3.1 estão apresentados a composição iônica segundo ordem de adição, quantidade e a pureza de cada um deles para o preparo de um litro da solução.

Os suportes porosos foram expostos à solução SBF por três semanas e foram removidos em períodos de sete dias. A formação de precipitados de fosfato de cálcio sobre a superfície foi avaliada por MEV (KOKUBO, 1990).

**Tabela 3.1** – Concentração iônica da solução SBF em comparação ao sangue humano.

Íon	Concentração iônica/ mM (mmol/L)	
	Plasma sanguíneo	Solução SBF
Na <sup>+</sup>	142.0	142.0
K <sup>+</sup>	5.0	5.0
Mg <sup>2+</sup>	1.5	1.5
Ca <sup>2+</sup>	2.5	2.5
Cl <sup>-</sup>	103.0	147.8
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	27.0	4.2
HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	1.0	1.0
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	0.5	0.5
pH	7.2-7.4	7.40

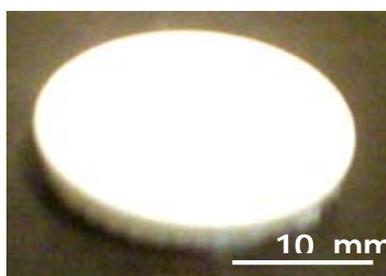
# CAPÍTULO IV

---

## RESULTADOS & DISCUSSÃO

### 4.1 – Produção de suportes poros de PHB

Suportes porosos de PHB foram obtidos pela técnica de lixiviação de sal, utilizando cloreto de sódio como agente porogênico. A concentração da solução de PHB utilizada foi de  $(9,8 \pm 0,2)$  % (p/v), determinada por peso seco, e a densidade da solução igual  $1,57 \text{ g/cm}^3$ . A Figura 4.1 mostra a fotografia de um suporte poroso de PHB típico obtido pela técnica de lixiviação de sal.



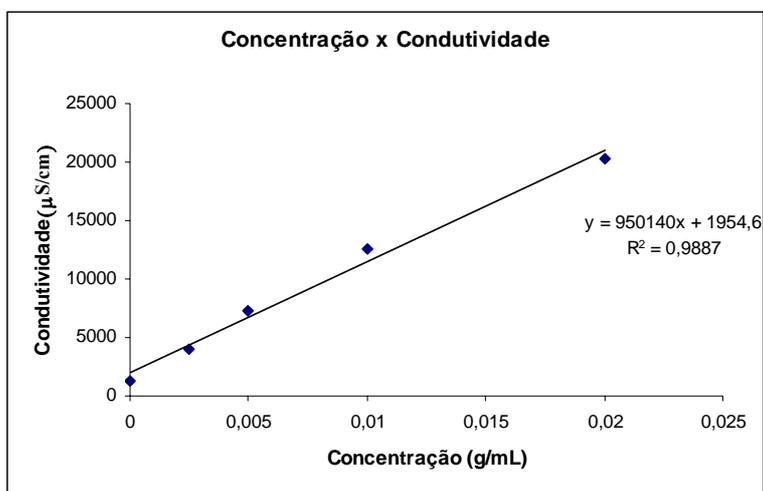
*Figura 4.1 – Suporte poroso de PHB obtido pela técnica e lixiviação de sal*

Os suportes apresentaram diâmetro de  $(20 \pm 0,26)$  mm e espessura de  $(0,92 \pm 0,11)$  mm.

### 4.2 – Construção da curva-padrão de condutividade

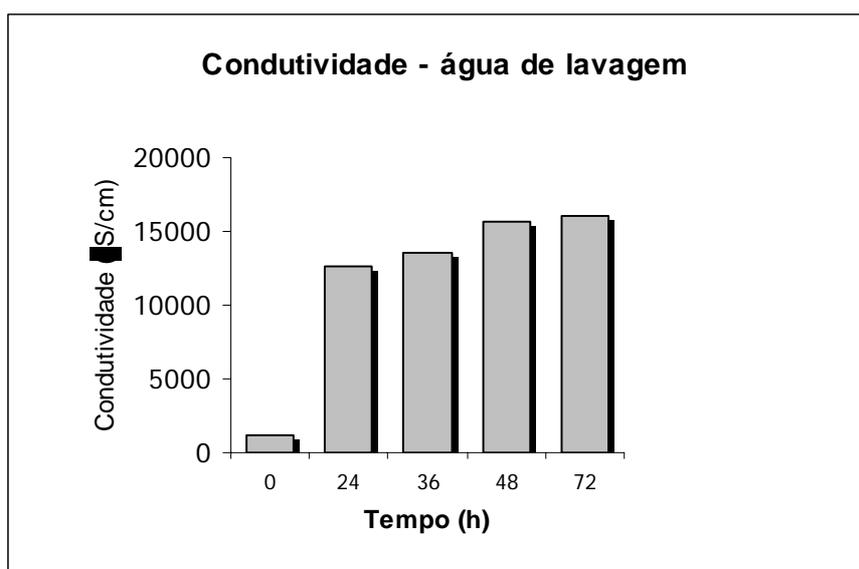
Na técnica de obtenção de suportes porosos por lixiviação de sal um dos inconvenientes é que, em alguns casos, nem todo sal é removido (HUTMACHER, 2000). Nesta técnica a remoção do sal é de suma importância para a obtenção da estrutura porosa. Sendo assim, neste trabalho, a remoção de sal foi monitorada por ensaios de condutividade. Com medidas de condutividade da água de lavagem torna-se possível, a determinação do tempo de imersão necessário para que o sal seja removido. O acompanhamento da remoção de sal através de medidas de condutividade é um método indireto e simples que pode ser realizado no decorrer do processo sem que haja comprometimento do suporte poroso

A Figura 4.2 mostra a curva-padrão de condutividade obtida para o cloreto de sódio a 24,5°C. O parâmetro  $R^2$  para esta curva foi igual a 0,9887 o que indica que o método de construção da curva foi eficiente.



*Figura 4. 2 – Curva-padrão de condutividade para o cloreto de sódio.*

Os valores de condutividade de água de lavagem em função do tempo de imersão são mostrados na Figura 4.3. Como pode ser observado, quanto maior o tempo de imersão maior a condutividade. Um valor de condutividade elevado indica que o sal está sendo removido do suporte uma vez que a condutividade é proporcional à quantidade de íons presentes em solução. Como pode ser observado na Figura 4.3, a variação da condutividade entre os períodos de 48 e 72 horas, não foi expressiva. Sendo assim, com base nos dados de condutividade, o período de 48 horas mostrou-se eficiente para o processo de lixiviação de sal.



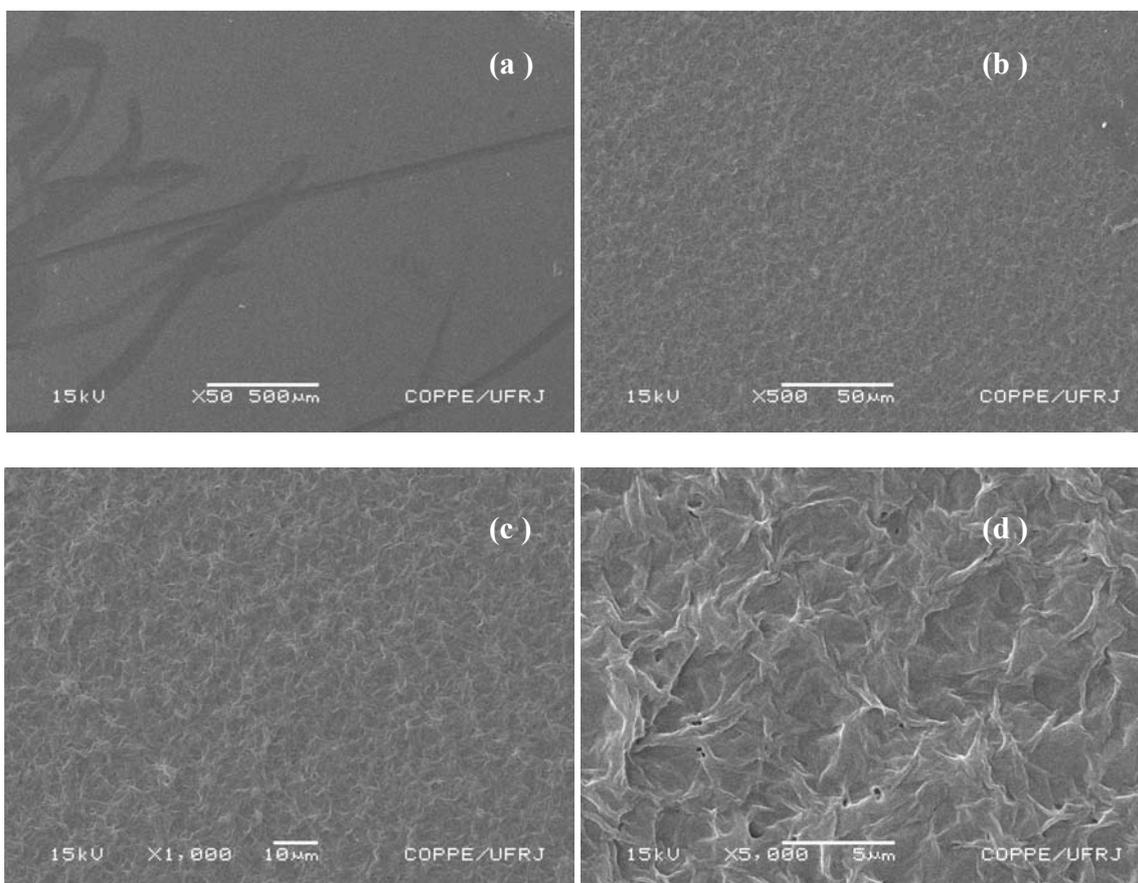
**Figura 4.3** – Condutividade da água de lavagem de suportes porosos de PHB.

A condutividade da água de lavagem após 48 h de imersão foi de  $(15.494 \pm 2,95)\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ . Este valor de condutividade, de acordo com a curva-padrão, corresponde a uma concentração de aproximadamente 0,01425 g/ mL, o que equivale a dizer que, em 48 h,  $(95 \pm 2) \%$  do sal foi removido.

### 4.3 – Caracterização dos suportes porosos de PHB

#### 4.3.1 - Morfologia

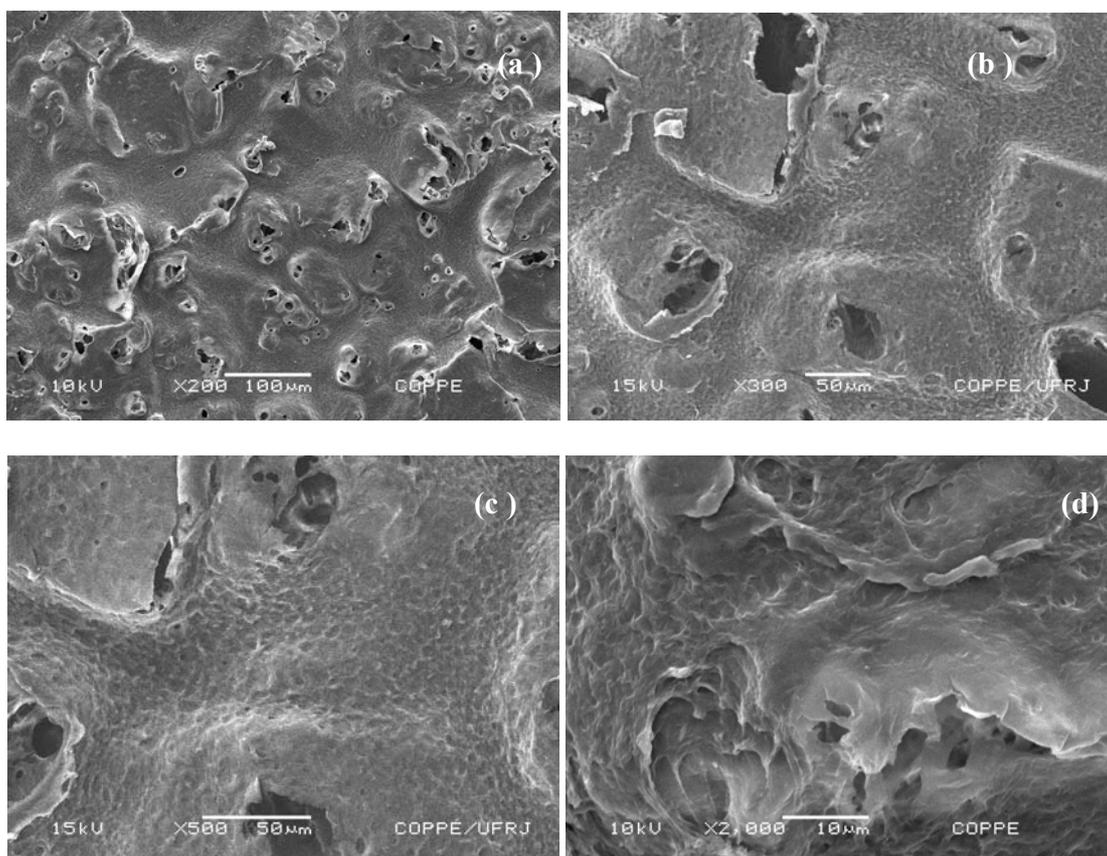
Quando suportes porosos são produzidos pela técnica de lixiviação de sal, obtêm-se duas superfícies distintas: a superfície que seca ao ar livre e a que fica em contato com o fundo do molde. Estas superfícies são diferentes, pois se formam sob condições de secagem diferentes.



**Figura 4. 4** – Micrografias eletrônicas de varredura da superfície de suportes porosos de PHB expostas ao ar: (a) 50 x.; (b) 500x ; (c) 1000 x; (d) 5000 x.

A Figura 4.4 mostra micrografias eletrônicas de varredura da superfície dos suportes porosos de PHB formadas em contato com o ar. Com base nas imagens apresentadas na Figura 4.4, pode-se perceber que as superfícies dos suportes porosos de PHB apresentaram poucos poros, que são perceptíveis na imagem de maior aumento (Figura 4.4 (d)). Estes poros podem estar relacionados à evaporação do solvente.

A Figura 4.5 mostra micrografias eletrônicas de varredura da superfície formada em contato com o fundo do molde.

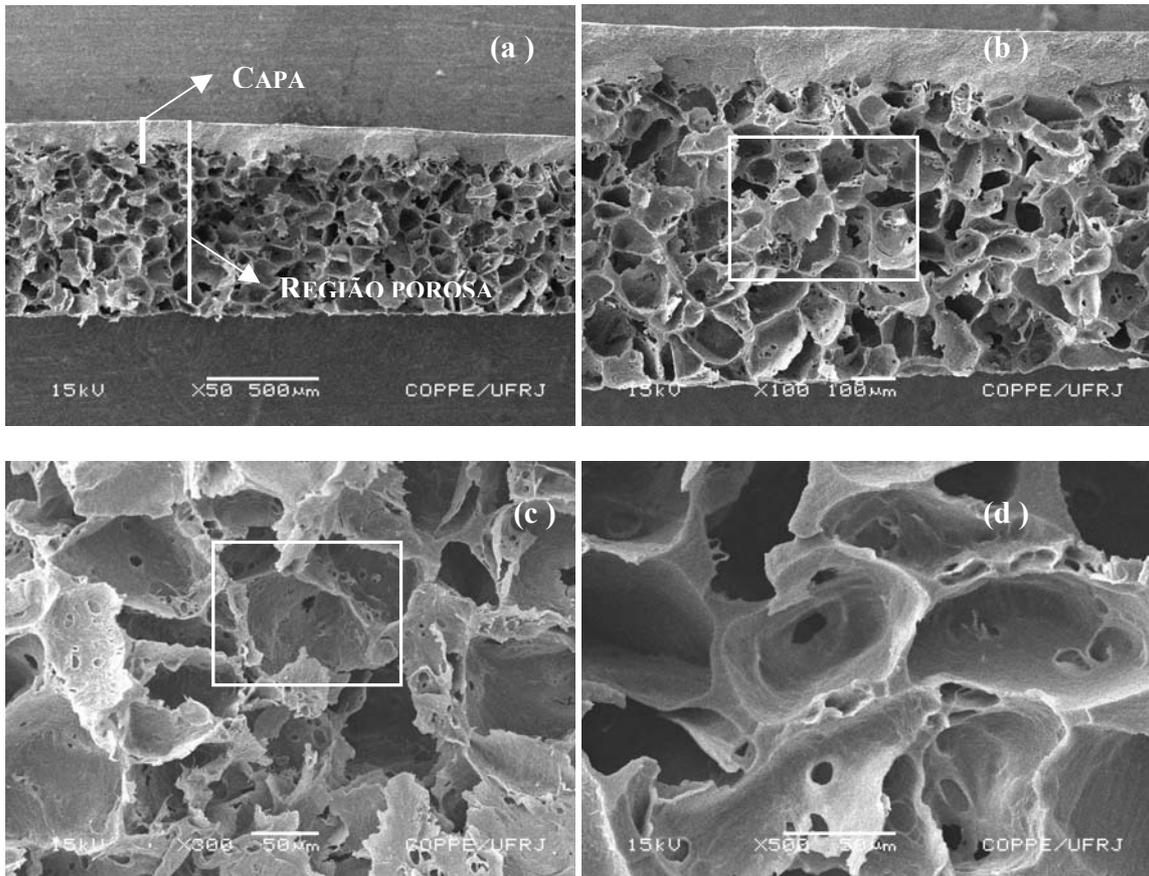


**Figura 4.5** – Micrografia eletrônica de varredura de superfície dos suportes porosos de PHB formadas em contato com o vidro: (a) 200 x; (b) 300 x; (c) 500 x; (d) 2000 x.

A superfície dos suportes formadas em contato com vidro apresentou morfologia diferente da morfologia das superfícies expostas ao ar. A superfície em contato com o vidro apresentou poros que provavelmente estão relacionados à deposição de cloreto de sódio no fundo do molde.

A Figura 4.6 mostra micrografias eletrônicas das superfícies de fratura dos suportes porosos de PHB. Estas imagens mostram que o processo de lixiviação foi efetivo na obtenção de uma estrutura porosa. Suportes porosos produzidos pelo método de lixiviação de sal possuem estrutura de poros que reflete o formato e o tamanho das partículas do agente porogênico utilizado, mas não permite a predição da interconectividade dos poros (MA, 2004). A arquitetura desses suportes contribui significativamente para funções biológicas específicas provendo organização estrutural para a morfogênese.

Pode-se observar, com base na Figura 4.6 (a) e (b), que os suportes se dividem em duas regiões (indicadas na Figura 4.6 (a)): uma camada densa localizada na porção superior e uma camada porosa, localizada na porção inferior (mais próxima ao molde). A formação da camada densa pode estar relacionada ao fato de que o agente porogênico, o cloreto de sódio, tende a se depositar no fundo do molde. O cloreto de sódio (densidade = 2,360 g/cm<sup>3</sup>) é mais denso que a solução de PHB (densidade = 1,57 g/cm<sup>3</sup>) o que faz com que este tenda a se depositar na parte inferior do molde, favorecendo a formação da capa densa na superfície do suporte poroso.



**Figura 4.6** – Micrografia eletrônica de varredura da superfície de fratura dos suportes porosos de PHB. (c)

*Detalhe da região ressaltada em (b); (d) Detalhe da região assinalada em (c).*

O tamanho médio de poros variou de 70 a 134,77  $\mu\text{m}$  e a espessura média da capa densa foi de  $(120,73 \pm 9,48)$   $\mu\text{m}$ . Estes dados foram obtidos com base nas imagens da Figura 4.6.

O tamanho de poros é um critério importante na utilização de suportes porosos em engenharia óssea, pois influencia diretamente a resposta dos osteoblastos. Estudos mostram que tamanho de poros de 15 a 50  $\mu\text{m}$  induzem o crescimento fibrovascular, na faixa de 50 a 150  $\mu\text{m}$  estimulam a formação de osso e na faixa de 150 a 500  $\mu\text{m}$  estão diretamente

relacionados à mineralização do osso (JANSEN, *et al.*, 2005). O tamanho de poros obtidos no presente trabalho se encaixa na faixa que estimula a formação de tecido ósseo.

#### 4.3.2 - Densidade dos suportes porosos de PHB

A Tabela 4.1 mostra os valores das variáveis utilizadas para o cálculo da densidade de suportes porosos e PHB.

*Tabela 4.1 - Variáveis utilizadas no cálculo da densidade de suportes porosos de PHB.*

Variável	Valor
Massa do suporte poroso de PHB	(0,0414 ± 0,01*) g
Massa aparente do suporte poroso de PHB	(-0,0477 ± 0,003*) g
Densidade da água a 25° C.	1,0 g/cm <sup>3</sup>
<b>Densidade dos suportes porosos de PHB **</b>	<b>(0,4732 ± 0,014*) g.cm<sup>-1</sup></b>

\* Desvio padrão.

\*\* O valor da densidade dos suportes porosos de PHB foi obtido pela Equação (2).

#### 4.3.3 Porosidade dos suportes porosos de PHB

A Tabela 4.2 apresenta os valores das variáveis utilizadas para a determinação da porosidade dos suportes porosos.

**Tabela 4.2** - Variáveis utilizadas no cálculo da porosidade dos suportes porosos de PHB.

Variável	Valor
Massa do suporte poroso de PHB	(0,0414 ± 0,01*) g
Volume de poros (vp)	(0,0330 ± 0,0068*) cm <sup>3</sup>
Volume do suporte poroso (V) **	(0,0891 ± 0,02*) cm <sup>3</sup>
Porosidade	(38,74 ± 13*) %
<b>Volume de poros /massa do suporte poroso</b>	<b>(1,74 ± 0,098) cm<sup>3</sup>/g</b>

\* Desvio padrão

\*\*Valor obtido pela Equação (3)

De acordo com a literatura, a porosidade dos suportes porosos produzidos pela técnica de lixiviação de sal fica na faixa de 20-50% (HUTMACHER, 2000). WIDMER *et al.*, (1998) obtiveram suportes porosos de poli(ácido-lático-co-glicólico) (PLGA) com porosidade em torno de 57%, utilizando 70% em massa de agente porogênico. Sendo assim, os suportes produzidos neste trabalho apresentaram valor de porosidade condizente com os demais suportes porosos poliméricos produzidos pela técnica de lixiviação de sal.

#### 4.4 Aminólise

Os grupos ésteres podem ser hidrolisados em meio alcalino. O mecanismo de hidrólise de ésteres promovida por base envolve reações de adição e de eliminação nucleofílica no carbono acílico (Figura 4.7). Os éteres também sofrem reação de adição e de eliminação nucleofílica nos átomos de carbono acílico quando são tratados com compostos aminados

(reação de aminólise) (SOLOMONS, 2002). Na reação de aminólise, grupamentos amino podem ser introduzidos na superfície do poliéster através da reação com uma diamina.

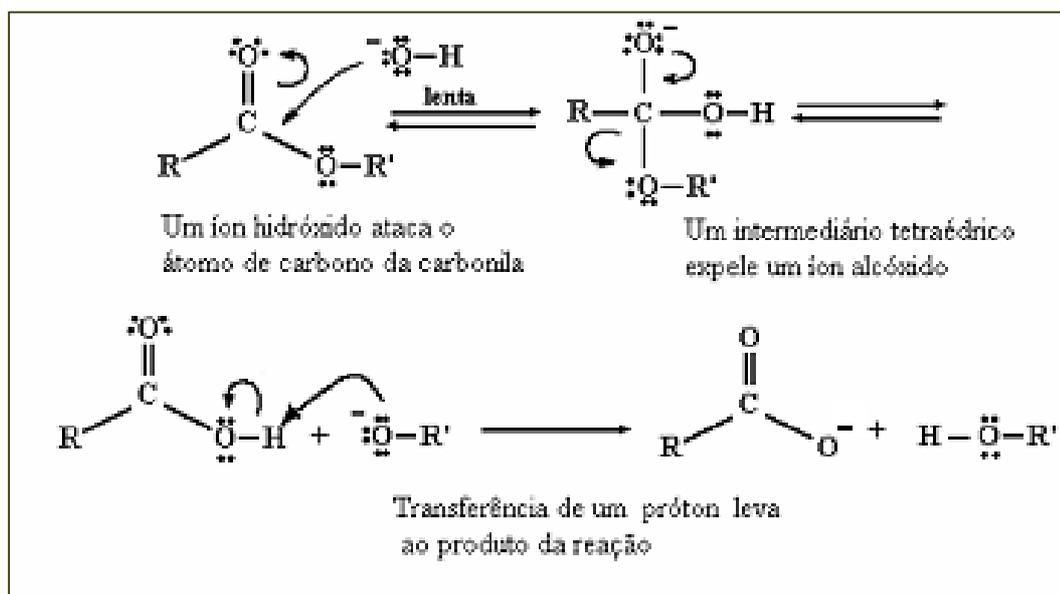
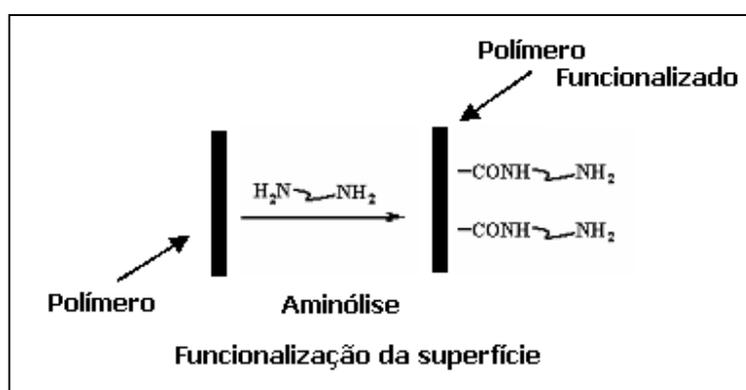


Figura 4.7 - Hidrólise básica de grupos éteres.(Adaptado de Solomons,2002).

Para introdução do grupo amino, ocorre reação entre o nitrogênio da diamina e o grupo éster do poliéster. A representação esquemática da aminólise pode ser observada na Figura 4.8. O produto da reação entre o grupo amino e o éster é a formação de uma ligação do tipo - CONH-. Por se tratar de uma reação com uma diamina, um dos grupamentos amino reage com o carbono carbonílico ao passo que o outro, o não reagido, fica livre como mostrado no esquema da Figura 4.8. Durante o processo de aminólise, cadeias terminadas em grupos amino e hidróxi são formados na superfície do poliéster. Algumas vantagens em engenharia de tecidos são esperadas com a introdução de grupos amino. São elas:

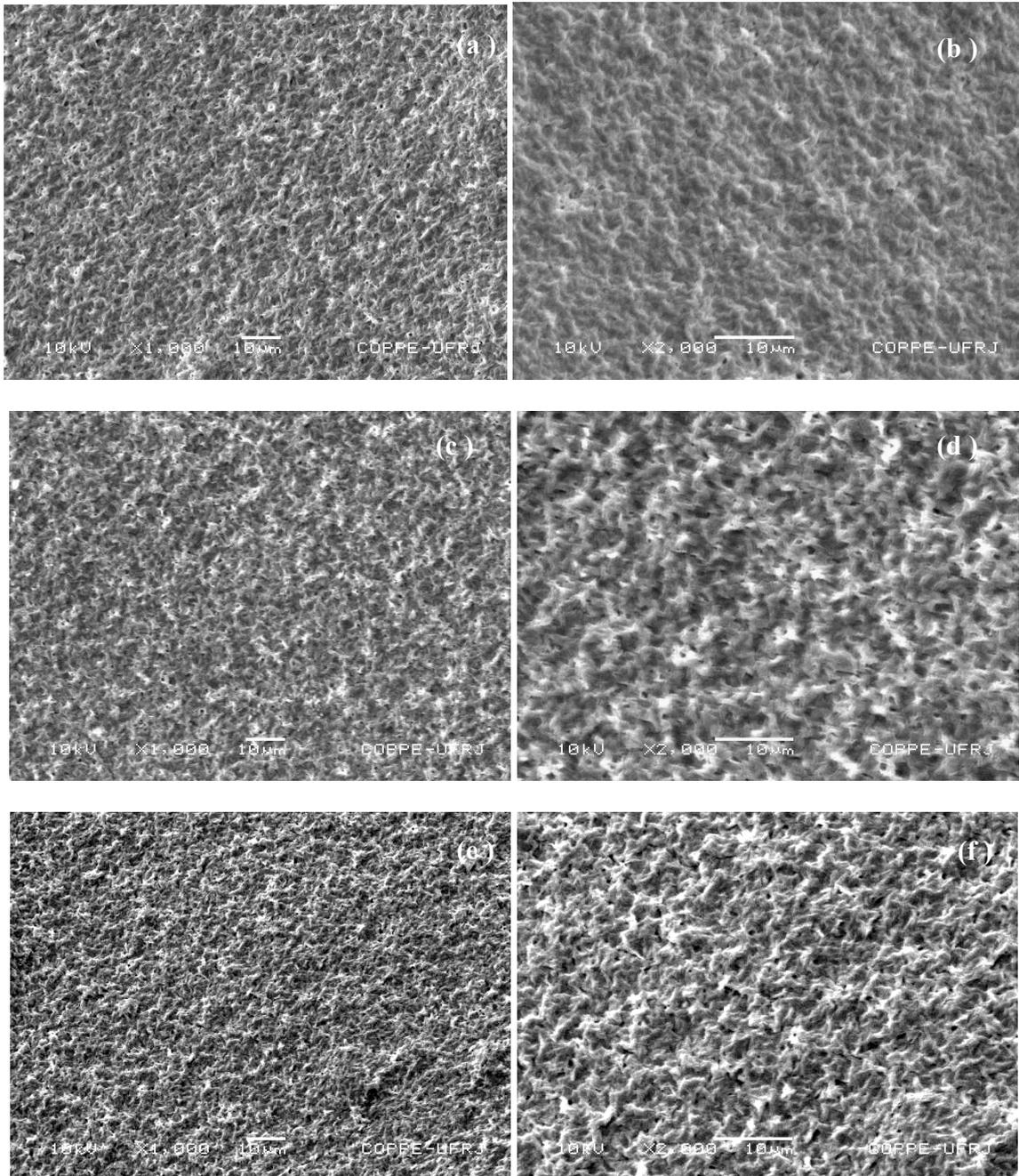
- Os grupos amino são atóxicos;
- Diminuição da hidrofobicidade da superfície;

- Neutralização de grupamentos ácidos derivados do produto de degradação dos suportes porosos;
- Criação de sítios ativos para a imobilização de biomoléculas como, por exemplo, gelatina, ou peptídeos como arginina, ácido aspártico e asparagina (RGD) (ZHU *et al.*, 2002).



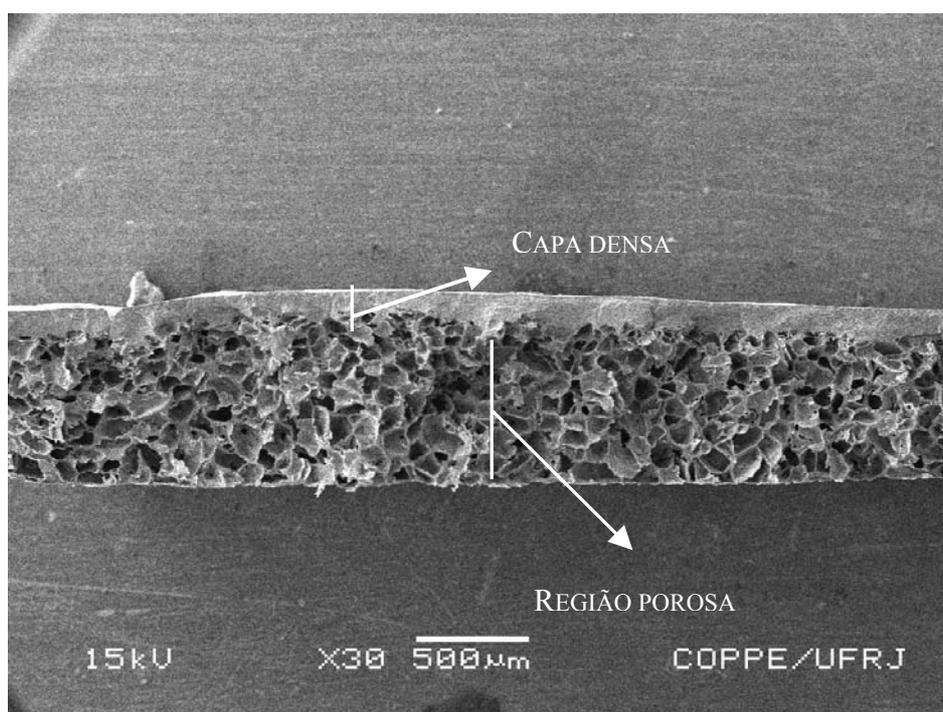
**Figura 4.8** – Representação esquemática da aminólise (adaptado de Zhang, *et al.*, 2007)

A Figura 4.9 mostra micrografias eletrônicas de varredura da superfície de suportes porosos de PHB modificados com etilendiamina. Como pode ser observado, a alteração morfológica provocada pela aminólise foi significativa e ocorreu em função do tempo de modificação empregado.



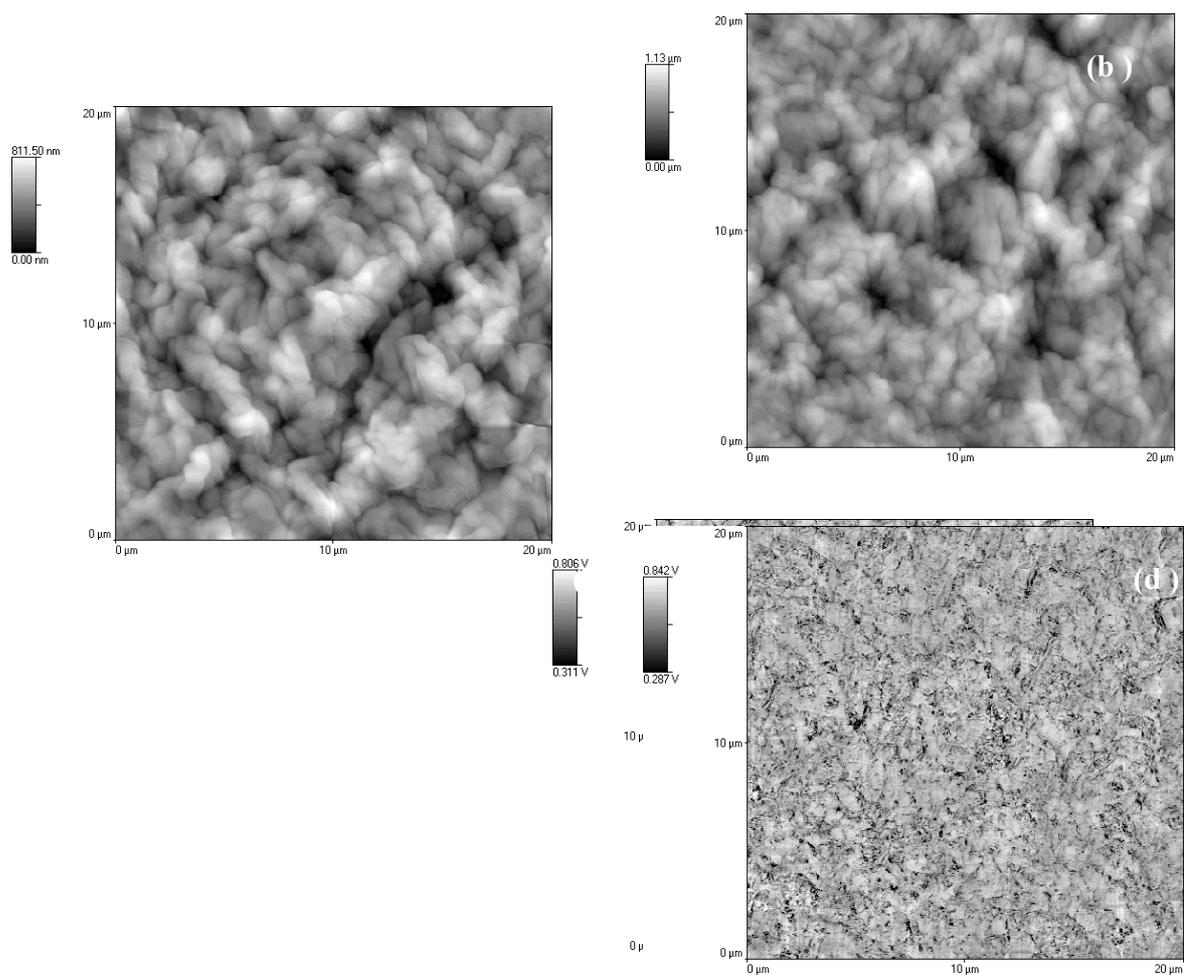
**Figura 4.9** – Micrografias eletrônicas de varredura da superfície dos suportes porosos de PHB modificados com etilenodiamina por: 45 (a, b); 90 (c, d) e 120 minutos (e, f). À esquerda aumentos de 1000 x e à direita aumentos 2000 x.

As superfícies dos suportes porosos tornaram-se mais rugosas. O aumento da rugosidade pode ter sido provocado pela quebra das cadeias superficiais em decorrência da hidrólise básica. Comparando-se as imagens de MEV dos suportes porosos de PHB não modificados mostradas na Figura 4.4 com as imagens apresentadas na Figura 4.9, percebe-se que além do aumento da rugosidade pequenos poros foram formados na superfície das amostras modificadas com etilenodiamina. A análise das imagens da seção de fratura de suportes modificados com etilenodiamina (Figura 4.10) mostrou que o processo de modificação não alterou a estrutura de poros dos suportes porosos, ou seja, a modificação ficou restrita à superfície.



**Figura 4.10** – Imagem de microscopia eletrônica de varredura de um suporte poroso de PHB modificado com etilenodiamina por 90 min.

A Figura 4.11 mostra imagens de microscopia de força atômica (AFM) da superfície dos suportes porosos de PHB antes e após a modificação com etilenodiamina por um período intermediário de 90 min.



**Figura 4.11** – Imagens de microscopia de força atômica de suportes de PHB não modificado((a) e(c) (contraste topográfico e de fase respectivamente) e modificado com etilenodiamina por 90 min ((b) e (d) (contraste de fase e topográfico respectivamente)).

Assim como foi evidenciado nas imagens de MEV, as imagens de AFM mostraram que a aminólise modificou a superfície do suporte. A análise da rugosidade (RMS) obtida por microscopia de força atômica confirmou o aumento da rugosidade dos suportes aminolisados, passando de 135,2 nm para 173,2 nm após 90 min de reação.

O contraste de fase é uma importante extensão do AFM no modo dinâmico. Por meio do monitoramento da diferença de fase entre a oscilação da haste e o sinal padrão, que movimenta a cerâmica piezoelétrica durante a varredura, é possível detectar variações na composição, adesão, atrito e viscoelasticidade, entre outras propriedades (GEOFFREY *et al.*, 2000).

As imagens de contraste de fase (Figura 4.11 (c) e (d)) mostram que o tratamento com etilenodiamina modificou a superfície dos suportes porosos de PHB e que esta modificação não foi somente em termos de morfologia. Após a aminólise, não foi identificada a formação de fases diferentes por contraste de fase. A Figura 4.11 (a) mostra que a superfície do suporte não modificado é formada por estruturas alongadas.

Na Tabela 4.3 são apresentados os resultados da composição atômica da superfície dos suportes porosos de PHB antes e após a modificação com etilenodiamina obtida por EDS. Os dados mostram que as amostras não modificada e modificada por 45 min não apresentaram átomos de nitrogênio em sua composição. Para o resultado encontrado referente ao suporte modificado com etilenodiamina por um período de 45 min, duas hipóteses são possíveis: a quantidade de nitrogênio incorporada pode estar abaixo do limite de detecção do método, não sendo possível assim detectá-la ou 45 min não foi tempo suficiente para que grupos nitrogenados fossem incorporados à superfície dos suportes porosos. Para amostras modificadas com etilenodiamina por um período maior ou igual a

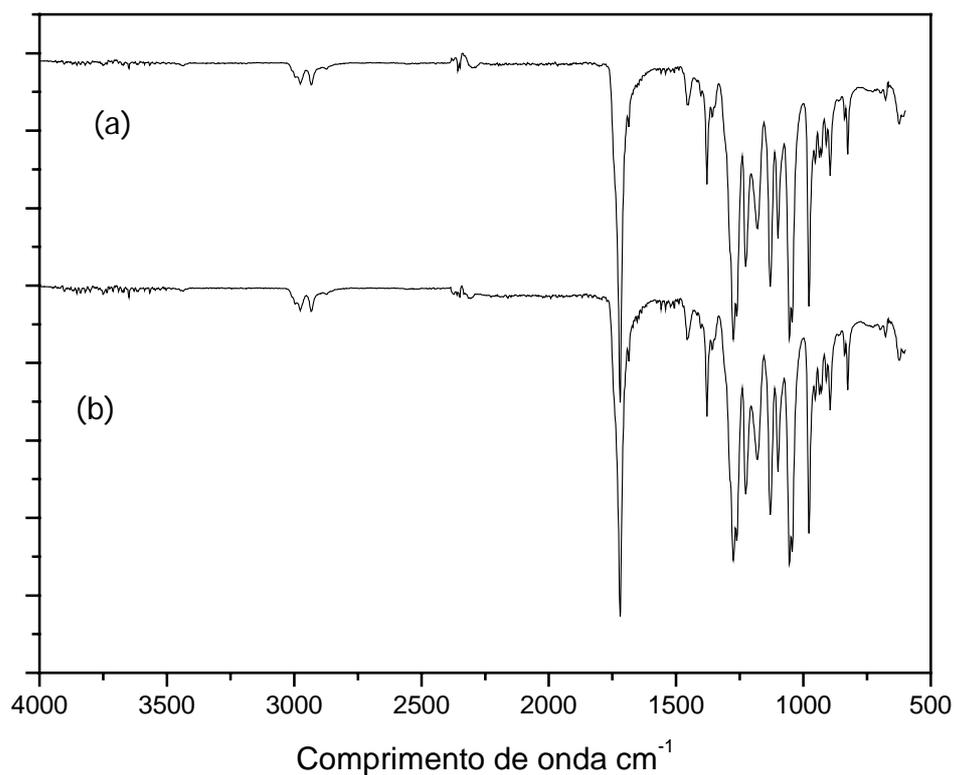
90 min pôde-se confirmar a incorporação de nitrogênio. O aumento do teor de nitrogênio na superfície foi proporcional ao tempo de imersão do suporte em solução de etilenodiamina. Esta tendência também foi observada por THIRÉ *et al.* (2007) ao avaliar o efeito do tratamento com etilenodiamina na composição química da superfície de filmes de PHB por espectrometria de raios X (XPS).

**Tabela 4.3** - Composição atômica de suportes porosos de PHB não modificados e modificados com etilenodiamina.

Suportes porosos de P(3HB)	Composição atômica (% a/ a)		
	C	O	N
Não modificado	75,58	24,42	-
Modificado – 45 min.	75,64	24,36	-
Modificado - 90 min.	67,27	22,60	10,13
Modificado - 120 min.	63,94	22,08	13,98

Embora a análise química por EDS tenha mostrado que houve incorporação de grupos nitrogenados na superfície dos suportes porosos modificados com etilenodiamina por períodos de modificação iguais a 90 e 120 min, a análise de espectrometria de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) não revelou bandas características referentes às ligações do tipo -NH<sub>2</sub> ou -CONH - (Figura 4.12). As possíveis bandas que caracterizariam a reação de aminólise e que não foram observadas no espectro são: bandas

características de ligação N-H em torno de  $3270\text{ cm}^{-1}$ , deformação axial de C=O de amida por volta de  $1655\text{ cm}^{-1}$ , deformação angular de N-H em aproximadamente  $1600\text{ cm}^{-1}$  e deformação de CN de amida por volta de  $1421\text{ cm}^{-1}$ .



**Figura 4.12** - Espectros de FTIR: suporte poroso de PHB não modificado(a) e modificado com etilenodiamina (b).

Este resultado não significa, necessariamente, que não houve formação destes tipos de ligação. A quantidade de nitrogênio adicionada aos suportes pode estar abaixo do limite de detecção do método. Além disso, é importante salientar que FTIR não é uma técnica voltada especificamente para análise de superfície. A profundidade de penetração

da radiação infravermelha é função do índice de refração do cristal, da amostra e do ângulo incidente (BUENO, 1989).

A Tabela 4.4 apresenta os valores de ângulo de contato e energia de superfície obtidos para suportes não modificados e modificados com etilenodiamina.

**Tabela 4.4** - Ângulo de contato e energia de superfície de suportes porosos de PHB modificados e não modificados com etilenodiamina

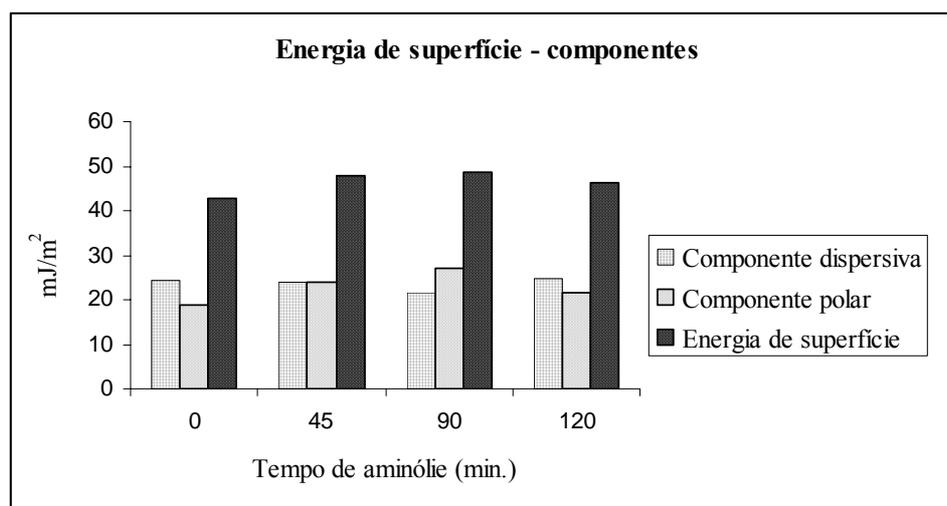
Suporte Poroso	Ângulo de Contato	Energia de Superfície (mJ/m <sup>2</sup> )
Não Modificado	62,79 ± 0,1*	42,80
Modificado - 45 min	56,6 ± 0,5*	47,86
Modificado - 90 min	53,2 ± 0,5*	48,60
Modificado - 120 min	58,3 ± 0,9*	46,25

\* Desvio padrão.

O valor de ângulo de contato encontrado para o suporte sem modificação confere com valores de ângulo de contato obtidos para filmes de PHB encontrados na literatura (YANG *et al.* 2006). A aminólise não provocou mudanças expressivas no ângulo de contato da superfície de suportes porosos de PHB. O tratamento estatístico dos resultados mostrou que os valores de ângulo de contato obtidos para tempos de modificação iguais a 90 e 120 minutos apresentam diferença significativa em relação ao suporte não modificado ( $p < 0,05$ ) ao passo que para o período igual a 45 min não ( $p > 0,05$ ). Para o período de modificação igual a 90 min a superfície dos suportes modificados se tornou, ligeiramente,

mais hidrofílica do que a superfície dos suportes porosos de PHB antes da modificação. Provavelmente, este ligeiro aumento de hidrofílicidade está atrelado ao aumento da polaridade promovido pela inserção de grupos amino na superfície dos suportes. Contudo, observou-se que, ao contrário do esperado, para a superfície modificada por 120 min obteve-se um valor de ângulo de contato maior do que os encontrados para os demais suportes aminolisados. Seguindo a lógica dos resultados de composição atômica esperava-se que a superfície do suporte poroso modificado por 120 min fosse mais hidrofílica o que, no entanto, não ocorreu.

Existe uma correlação direta entre a rugosidade e a energia de superfície dos materiais. Estudos sistemáticos mostraram que a componente apolar aumenta significativamente com o aumento da rugosidade (ANSELME, 2000). Como foi dito anteriormente, a rugosidade aumenta em função do tempo de aminólise. A Figura 4.13 mostra a variação da energia de superfície e de suas componentes em função do tempo de aminólise.



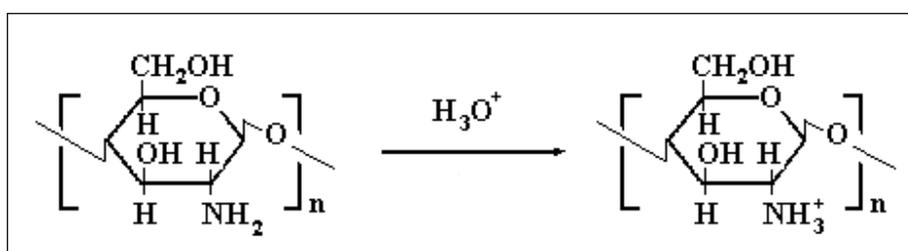
*Figura 4.13 – Variação da energia de superfície e suas componentes polar e dispersiva.*

Como pode ser observado na Figura 4.13 a aminólise promoveu o aumento da componente polar, provavelmente em decorrência da inserção de grupos amino à superfície do suporte. Contudo, pode-se observar que para o suporte modificado com etilenodiamina por 45 min, as contribuições polar e dispersiva são iguais. Para o período de aminólise igual a 90 min a contribuição polar foi maior quando comparada ao demais tempos de modificação. Em consequência disto, para 90 min de modificação, obteve-se menor ângulo de contato e maior energia de superfície. Após 90 min, foi observado que a contribuição dispersiva foi maior do que a polar, o que acarretou em uma ligeira redução da energia de superfície, provavelmente em decorrência do aumento de rugosidade.

Pesquisas mostram que a molhabilidade da superfície é melhorada pela hidrólise, como resultado do aumento de grupos hidrofílicos como carboxil e hidroxil. Contudo, o equilíbrio é alcançado com o aumento da taxa de remoção de fragmentos de oligômeros solúveis que é igual à taxa de formação de novos grupos terminais (LIU *et al.*, 2005). Para o poli(tereftalato de etila) (PET), LIU *et al.* (2005) observaram que com o aumento do tempo de hidrólise para períodos de reação maiores do que 60 min, ocorre o aumento da rugosidade da superfície e aumento no ângulo de contato. No presente trabalho, pela análise das micrografias eletrônicas mostradas na Figura 4.9, infere-se que quanto maior o tempo de modificação da superfície dos suportes porosos de PHB, maior a rugosidade do material. Desta forma, os valores de ângulo de contato para suportes porosos modificados com etilenodiamina encontram respaldo na literatura, ou seja, por ter ocorrido um aumento de rugosidade na superfície do suporte poroso de PHB modificado com etilenodiamina por 120 minutos, este apresentou maior ângulo de contato, quando comparado aos demais suportes modificados, os quais são, supostamente, menos rugosos.

#### 4.5 Adsorção de quitosana

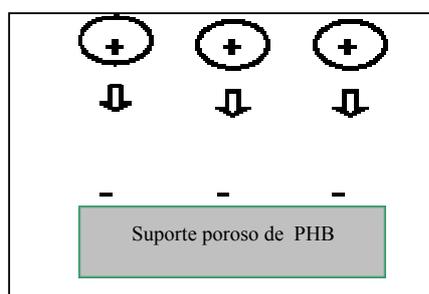
A solubilização da quitosana ocorre devido a protonação da função  $\text{NH}_2$  encontrada na posição C-2 das unidades de repetição D-glucosamina. Sendo assim, em meio ácido, a quitosana é convertida em polieletrólito. A Figura 4.14 mostra o equilíbrio de ionização da quitosana em meio ácido.



**Figura 4. 14** – Representação do equilíbrio de ionização da quitosana.

No presente trabalho, quitosana foi solubilizada em meio ácido em pH variando de 3,5 a 4 e suportes porosos de PHB foram imersos nesta solução por períodos variando de 3 a 24 h. (RINAUDO, *et al.*, 1999). Na faixa de pH utilizada, poliésteres tendem a sofrer hidrólise catalisada por ácido. A reação de hidrólise é uma reação inversa à reação de esterificação e é uma reação lenta e reversível. O PHB pode sofrer hidrólise tanto sob condições alcalinas quanto em soluções ácidas. Tanto em condições alcalinas quanto em condições ácidas, a reação de hidrólise ocorre com cisões aleatórias das ligações ésteres (YU *et al.*, 2005). Em soluções ácidas, os prótons podem agir como catalisadores tanto para o processo de hidrólise quanto para o processo de esterificação. Desta forma, depois da hidrólise, os ácidos carboxílicos e os álcoois formados pela quebra das ligações éteres sofrem re-esterificação. A pH não muito ácido, variando de 3 a 4, a frequência de quebra de

ligações não é alta o suficiente para originar produtos hidrolíticos (monômeros e/ ou oligômeros) para deixar a fase sólida. Sendo assim, as ligações éteres quebradas são reformadas (YU *et al.*, 2005). Desta forma, espera-se que, ao imergir suportes porosos de PHB em solução de quitosana a pH 3,5 - 4 ocorra, concomitantemente, a presença de espécies positivamente carregadas (quitosana em solução – Figura 4.14) e espécies negativamente carregadas na superfície dos suportes porosos de PHB, espécies estas fruto da hidrólise ácida da superfície (grupos carboxil). Com espécies de cargas opostas co-existindo espera-se que ocorra adsorção eletrostática de quitosana na superfície de suportes porosos de PHB de acordo com o esquema mostrado na Figura 4.15.



**Figura 4.15** – Representação esquemática da adsorção eletrostática de quitosana à superfície de um suporte poroso de PHB negativamente carregado em função da hidrólise ácida.

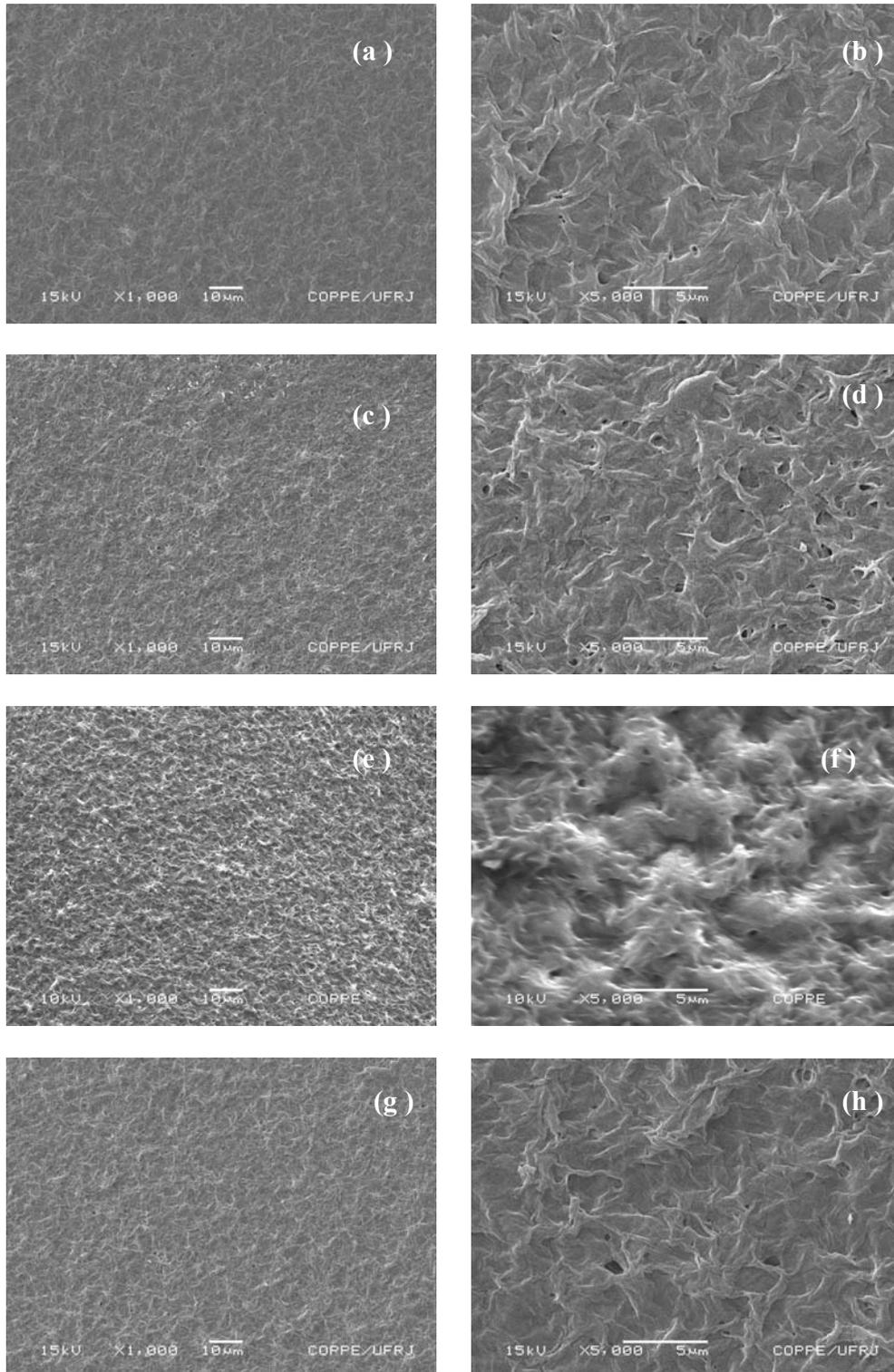
Segundo a literatura, uma das vantagens de introduzir quitosana na superfície de biomateriais é a redução da acidez provocada por produtos da degradação polimérica. Um bom exemplo é a inflamação local produzida pelos produtos de degradação do PLLA. Quando quitosana é introduzida, ela neutraliza os produtos de degradação devido a

presença de grupos funcionais como OH e NH<sub>2</sub> na superfície do material (ZHANG *et al.*, 2007).

A Figura 4.16 mostra imagens de microscopia eletrônica de varredura de suportes porosos de PHB modificados com quitosana a diferentes tempos. Como pode ser observado, a modificação com quitosana alterou morfologicamente a superfície dos suportes porosos de PHB em função do tempo de exposição do material à solução de quitosana. Nas imagens de maior aumento (Figura 4.16 (b), (c), (f) e (h)) as diferenças obtidas são nítidas.

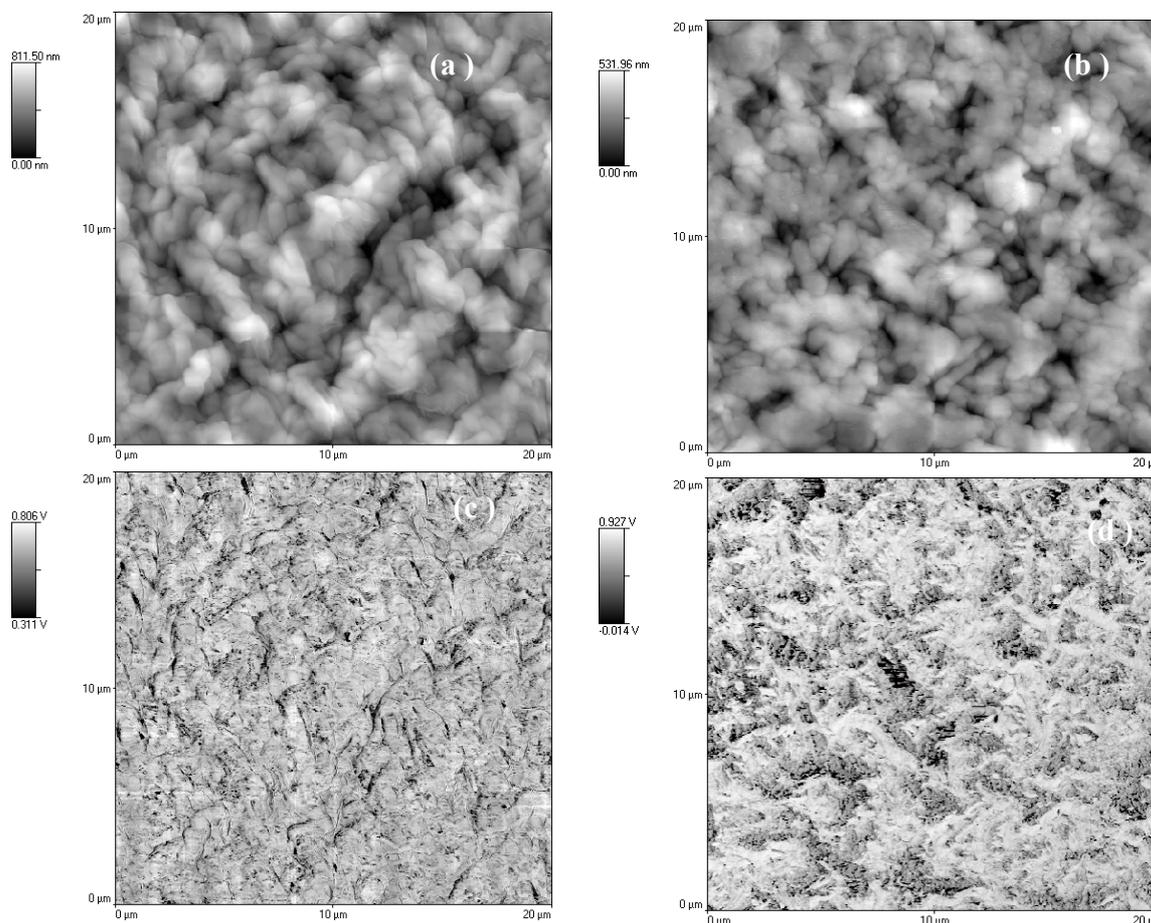
Comparando-se as imagens referentes ao período de modificação igual a 3 h com o suporte não modificado, percebe-se que, aparentemente, houve deposição de um filme fino de quitosana, pois, pode ser observada uma mudança na topografia do suporte. Esta mudança, no entanto, parece seguir a orientação ditada pelo suporte não modificado (Figura 4.16 (a) e (b)). Para um período de modificação igual a 12 h (Figura 4.16 (e) e (f)), a superfície do suporte poroso apresentou uma morfologia mais complexa, a qual sugere uma sobreposição de camadas de quitosana. A morfologia deste suporte é mais diferenciada do que a dos demais, quando comparado ao suporte não modificado, enquanto que a superfície dos suportes porosos modificados por 24 h (Figura 4.16 (g) e (h)) é a mais semelhante.

A Figura 4.17 mostra as imagens de AFM dos suportes porosos de PHB não modificado e modificado com quitosana por 12 h. As imagens de AFM, assim como as imagens de MEV, mostram que a morfologia da superfície do suporte após a modificação foi alterada significativamente. A superfície modificada (Figura 4.17(b)) apresenta-se mais compactada, sendo composta por estruturas ovais e arredondadas com dimensões menores do que as observadas no suporte original (Figura 4.17(a)).



**Figura 4.16** – Micrografias eletrônicas de varredura suportes de PHB não modificados (a) e (b) e modificados com quitosana por 3 (c) e (d); 12 (e) e (f) 24 h (g) e (h). Aumentos de 1000 x à esquerda e de 2000 x à direita.

Foi verificado que a rugosidade média quadrática (RMS) dos suportes de PHB diminuiu de 135 nm para 87 nm após a modificação com quitosana por 12 h.

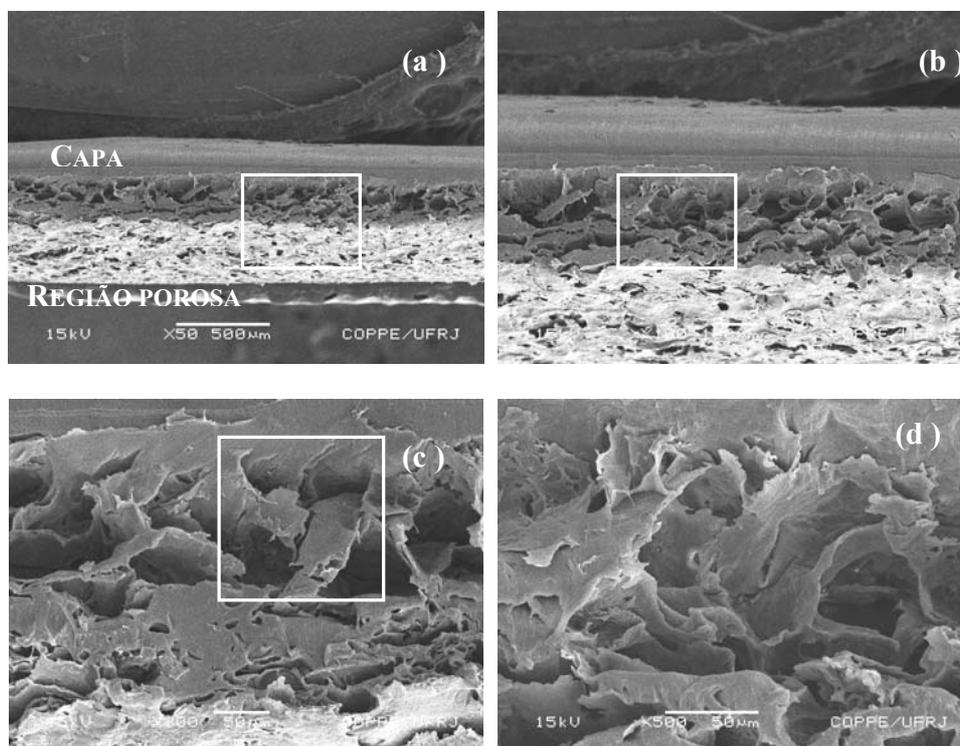


**Figura 4.17** – Imagens de microscopia de força atômica de suportes de PHB não modificado (a) e (c) (contraste topográfico e de fase respectivamente) modificado com quitosana por 12 h (b) (d) (contraste de fase e topográfico respectivamente).

Este fato deve-se, provavelmente, à deposição de quitosana na superfície do material. As imagens de contraste de fase (Figura 4.17(c) e (d)) mostram que o recobrimento com quitosana não foi homogêneo indicando que, na superfície coexistem duas espécies diferentes o PHB e a quitosana. Na Figura 4.17 (d) as regiões mais claras

correspondem ao PHB e as mais escuras correspondem a quitosana. Desta forma é bem provável que quitosana tenha se depositado entre as rugosidades da superfície do substrato.

A imersão dos suportes porosos de PHB em solução de quitosana por períodos iguais a 3 e 12 h não alterou significativamente a estrutura de poros, ao passo que, para o período de modificação igual a 24 h foi observado o colapso dos poros. A obstrução dos poros não é desejável, uma vez que a função destes é prover caminho para colonização por células e passagem de nutrientes. A Figura 4.18 mostra imagens das superfícies de fratura dos suportes modificados com quitosana por 24 h. Na região porosa mostrada nas Figuras 4.18 (a) e (b) se subdividem em duas regiões diferentes: uma clara e outra escura. Esta diferença é decorrente do processo de fratura onde se deu origem a uma superfície com uma seção fora do plano a qual corresponde a parte mais clara.



**Figura 4.18** – Micrografias eletrônicas de varredura da superfície de fratura de suportes PHB modificados por 24h. As regiões indicadas correspondem, respectivamente às subseqüentes.(a) 50 x; (b)100 x; (c) 300 x e (d) 500 x.

A Tabela 4.5 mostra os resultados obtidos por EDS referentes à composição atômica da superfície de suportes porosos de PHB não modificados e modificados com quitosana.

**Tabela 4.5** - Composição atômica de suportes porosos de PHB modificados ou não com quitosana

Suportes porosos de PHB	Composição atômica (% a)		
	C	O	N
Não modificado	75,60	24,40	-
Modificado com quitosana – 3 horas	62,89	21,54	15,57
Modificado com quitosana – 12 horas	66,88	23,50	9,62
Modificado com quitosana – 24 horas	68,79	23,20	8,01

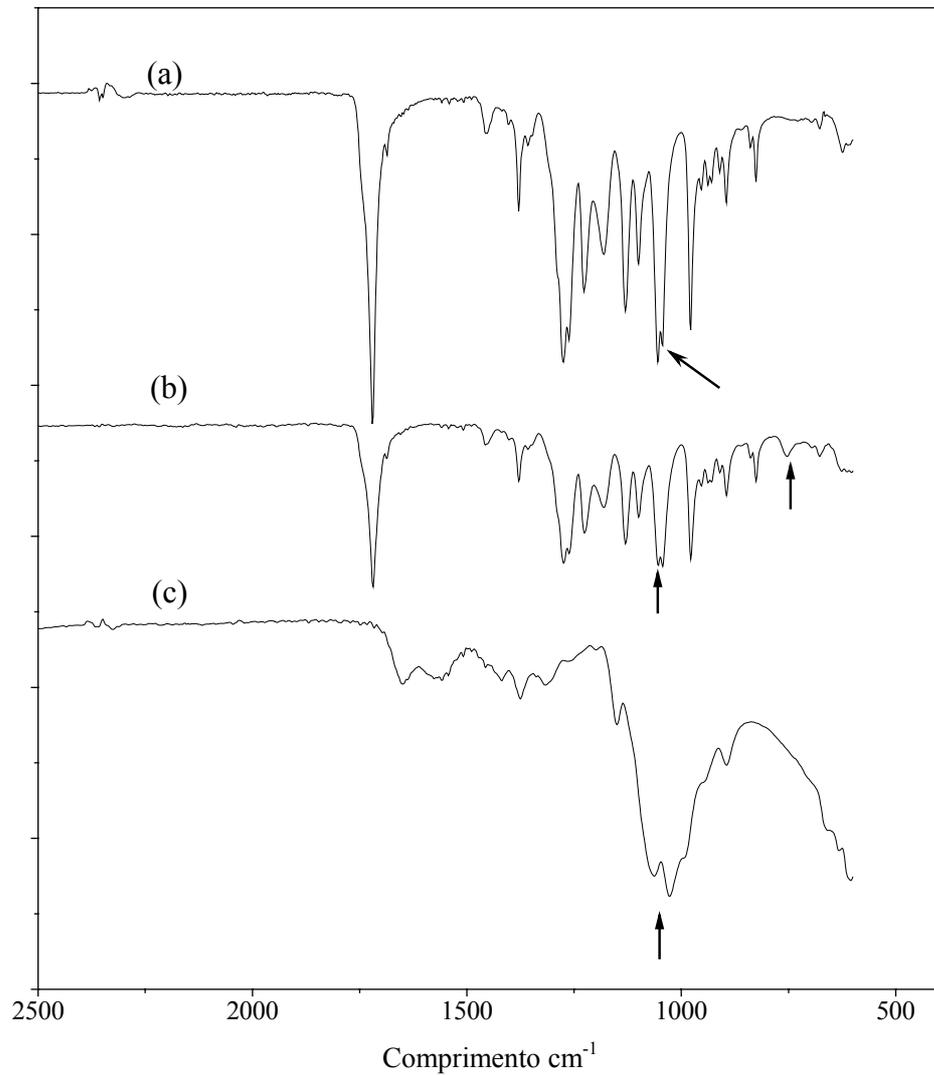
Como pôde ser observado na Tabela 4.5, a superfície dos suportes modificados com quitosana apresentaram nitrogênio em sua composição ao passo que, a superfície do suporte não modificado não apresentou. Este dado indica a presença de quitosana na superfície do suporte uma vez que a molécula de quitosana é composta por átomos de carbono, oxigênio, nitrogênio e hidrogênio.

O tempo de modificação afetou o teor de nitrogênio incorporado à superfície do suporte poroso. Quantitativamente, o melhor resultado, em termos de incorporação de

nitrogênio, foi obtido para o suporte tratado por 3 h. Este fato mostra que uma quantidade maior de quitosana foi adsorvida à superfície deste suporte, ao contrário do que sugere as imagens de MEV (Figura 4.16), onde mudança mais significativa foi observada para a superfície do suporte poroso modificado por um período de 12 h (Figura 4.16 (e) e (f)). De acordo com os dados fornecidos pela análise de EDS, o teor de átomos de nitrogênio incorporados à superfície dos suportes porosos diminui com o tempo de exposição dos suportes porosos à solução de quitosana. Períodos maiores do que 3 h podem ser o suficiente para re-solubilizar a quitosana depositada na superfície do material. Um estudo mais detalhado da interação PHB-quitosana deve ser conduzido.

A Figura 4.19 mostra espectros de FTIR obtidos para a quitosana e para as superfícies dos suportes porosos de PHB não modificados e modificados com quitosana. O espectro de infravermelho da quitosana (Figura 4.19 (c)) apresentou as seguintes bandas características: de deformação axial de C = O de amida por volta de  $1655\text{ cm}^{-1}$ ; deformação angular de N-H em aproximadamente  $1599\text{ cm}^{-1}$ ; deformação axial de -CN de amida em torno de  $1421\text{ cm}^{-1}$ ; deformação angular simétrica de  $\text{CH}_3$  em  $1379\text{ cm}^{-1}$ ; deformação axial de -CN de grupos amino entre  $1323$  a  $1379\text{ cm}^{-1}$  e bandas de estruturas polissacarídicas na região entre  $897$  a  $1153\text{ cm}^{-1}$ . A banda aguda a  $1377\text{ cm}^{-1}$  é atribuída à deformação simétrica do  $\text{CH}_3$ . A Figura 4.19 (a) mostra o espectro de infravermelho de suportes porosos de PHB não modificados. O espectro do suporte de PHB não modificado apresentou bandas intensas a  $1275,3$  a  $1720\text{ cm}^{-1}$  características do estiramento das ligações C = O do grupo carbonila, de  $1453$  a  $1380\text{ cm}^{-1}$  referentes à deformação assimétrica da ligação C-H dos grupos etileno e metileno,  $\text{CH}_2$  e  $\text{CH}_3$ , respectivamente e na faixa de  $978$  a  $1300\text{ cm}^{-1}$  relacionadas ao estiramento da ligação C – O do grupo éster. Após a modificação

com quitosana, não houve aparecimento de novas bandas de absorção (Figura 4.19 (b)). Como pode ser observado, as bandas características dos espectros referentes à quitosana e ao PHB ocorrem basicamente na mesma região, o que pode acarretar na sobreposição de bandas. Isto pode ser visualizado em relação às bandas de absorção indicadas por setas. A banda indicada por uma seta na Figura 4.19 (b) está modificada em relação à banda também indicada por uma seta na Figura 4.19 (a). O formato da banda indicada por uma seta na Figura 4.19 (b) sugere a ocorrência do somatório das bandas indicadas na Figura 4.19 (a) e (c).



**Figura 4.19** - Espectros de FTIR: (a) suporte poroso de PHB; (b) Suporte poroso de PHB modificado com quitosana e (c) quitosana.

Um outro fator a ser levado em consideração é a baixa concentração de quitosana na superfície do suporte poroso, o que acarreta a formação bandas menos expressivas quando comparadas às do PHB. As bandas características apresentadas na Figura 4.19 (b), quando comparadas às bandas respectivas na Figura 4.19 (a), apresentaram-se menos

intensas. Sendo assim, embora as mudanças observadas nos espectros dos suportes porosos tenham sido sutis, pode-se dizer que, provavelmente, houve incorporação de quitosana à superfície do suporte (SILVERSTEIN, 1991).

A Tabela 4.6 mostra os resultados referentes às medidas de ângulo de contato e energia de superfície dos suportes porosos não modificados e modificados com quitosana.

**Tabela 4.6** - Ângulo de contato e energia de superfície de suportes porosos de PHB modificados e não modificados com quitosana

<b>Suportes Porosos</b>	<b>Ângulo de Contato</b>	<b>Energia de Superfície (mJ/m<sup>2</sup>)</b>
Não Modificado	62,79 ± 0,1*	42,80
Modificado – 3h	67,49 ± 0,38*	35,51
Modificado – 12 h	66,08 ± 1,80*	35,32
Modificado – 24 h	68,14 ± 0,49*	30,32

\* Desvio padrão.

O tratamento estatístico dos valores de ângulo de contato mostrou que há diferença significativa entre os valores de ângulo de contato dos suportes modificados em relação ao suporte não modificado ( $p < 0,05$ ). Os valores de ângulo de contato dos suportes modificados com quitosana não apresentaram diferença significativa entre si ( $p > 0,05$ ).

De acordo com os dados apresentados na Tabela 4.6, a adsorção de quitosana à superfície dos suportes porosos de PHB promoveu um aumento, não muito significativo, da hidrofobicidade da superfície. De acordo com o esquema proposto para a deposição de quitosana na superfície dos suportes porosos de PHB (Figura 4.15), a parte polar da

molécula que confere à quitosana certa hidrofiliçidade está comprometida com a interface PHB/ quitosana, estando a porção menos polar voltada para cima na interface água suporte.

Os valores de ângulos de contato encontrados para os suportes modificados por quitosana estão de acordo com os informados na Literatura. NEAMNARK *et al.* (2007), investigou a hidrofiliçidade de filmes de quitosana. O caráter hidrofílico ou hidrofóbico dos filmes de quitosana foi avaliado através de medidas de ângulo de contato e o valor médio obtido foi 71°. LIU, *et al.* (2005), modificou a superfície de filmes de poli(tereftalato de etila) (PET) através da hidrólise e subsequente deposição de quitosana. A hidrólise do PET deu origem a grupos eletrostaticamente carregados favorecendo a deposição de quitosana. Os valores de ângulo de contato obtidos após a incorporação de quitosana ficaram compreendidos na faixa de 65 a 72°.

Sendo assim, pode-se concluir com base nos dados das análises de MEV, AFM, EDS, FTIR e ângulo de contato que quitosana foi adsorvida à superfície de suportes porosos de PHB.

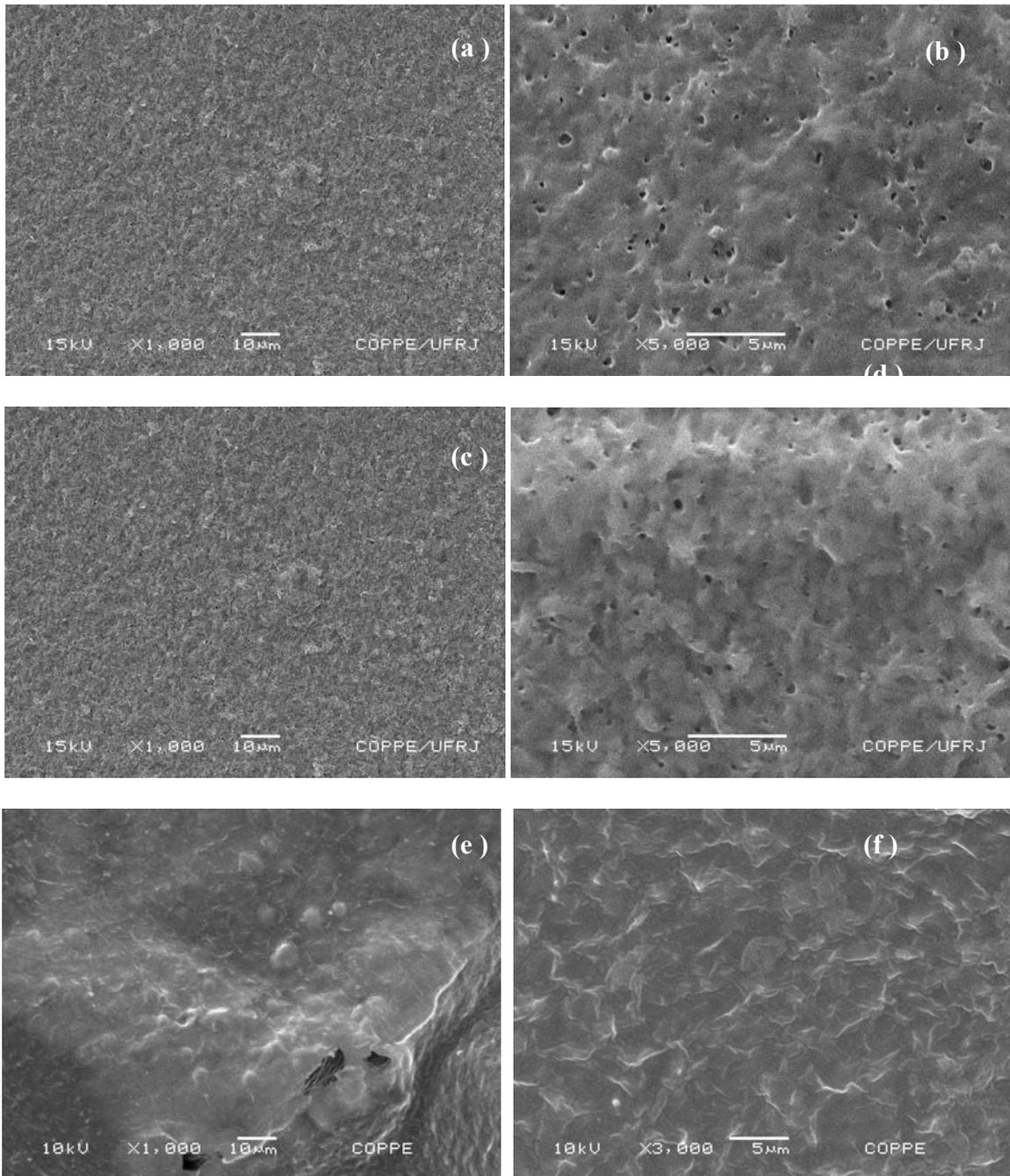
#### **4.6 – Imobilização de fibronectina na superfície de suportes porosos de PHB modificados ou não.**

Neste trabalho objetivou-se a imobilização de FN na superfície de suportes porosos de PHB. A presença de FN na superfície dos suportes porosos pode servir como ponto específico para adesões celulares específicas. No caso deste trabalho especificamente o foco foi a otimização da adesão de osteoblastos humanos à superfície de biomateriais à base de PHB.

A imobilização de proteína tem sido reportada nas últimas duas décadas. Todavia, na maioria dos casos, o processo de imobilização de proteínas na superfície de materiais poliméricos segue uma orientação não específica (CARBAJAL, *et al.*, 2003). As conformações da fibronectina são determinadas por interações eletrostáticas, e estas mudanças não são acompanhadas por modificações na estrutura secundária da molécula (WILLIAMS *et al.*, 1982; ÖSTERLUND, 1988). HOMANDBERG & ERIKSON, 1986; JOHNSON *et al.*, 1999)

No presente trabalho, a imobilização de FN na superfície de suportes porosos de PHB foi conduzida a pH 4,5. Segundo estudo realizado por COSTA e SILVA *et al.* (2004), o pH sob o qual FN é incubada parece influenciar a adesão de osteoblastos. Células em substratos previamente incubados com fibronectina em pH 4,5 ou 11,0 pareceram mostrar-se melhor aderidas, tanto do ponto de vista quantitativo quanto qualitativo. No entanto, resultados de morfometria mostraram que os osteoblastos se espalham mais sobre o substrato com filme de fibronectina incubado sob pH ácido.

A Figura 4.20 mostra as micrografias eletrônicas de varredura das superfícies não modificadas (Figura 4.20 (a) e (b)), modificada com etilenodiamina (Figura 20(c) e (d) e modificada com quitosana (Figura 4.20 (e) e(f)) todas recobertas com fibronectina.



**Figura 4. 20** – Micrografias eletrônicas de varredura da superfície de suportes porosos recobertos com FN: não modificado (a) e (b), modificados com etilenodiamina por 90 min (c) e (d) e modificados com quitosana por 12h (e) e (f). Aumentos de 1000 x à esquerda, de 5000 x (b e d) e de 3000 x (f).

Como pode ser observado um filme de FN foi formado na superfície de todos os suportes. No entanto, a morfologia foi diferente para cada superfície. A Figura 4.20 (f), sugere que o filme de FN formado sobre o suporte modificado com quitosana possui uma morfologia mais regular do que os demais filmes formados sobre as superfícies não modificadas (Figura 4.20 (a) e (b)) e modificada com etilenodiamina ((Figura 4.20 (c) e (d))). O aspecto dos filmes formados condiz com os valores de rugosidade obtidos para os suportes sem FN. Pode-se dizer que, a morfologia do filme de FN depende das características da superfície do suporte poroso. Sobre a superfície modificada com quitosana, o filme de FN parece estar estendido ao passo que, o filme formado na superfície do suporte poroso modificado com etilenodiamina apresenta-se mais irregular sugerindo a formação de dobras e/ ou sobre-camadas. Estes resultados sugerem que foi formado um filme fino e contínuo de FN, o qual acompanhou o relevo do substrato.

A Tabela 4.7 mostra os resultados da imobilização de fibronectina na superfície de suportes porosos de PHB previamente modificados ou não.

**Tabela 4.7 - Dosagem de proteínas em suportes porosos de PHB modificados ou não com etilenodiamina e recobertos com FN.**

<b>Suportes porosos</b>	<b>Proteína associada (%)</b>
Não modificado	94,7 ± 3,47*
Modificado com etilenodiamina por 90 minutos	132,3 ± 14,52*

\* Desvio padrão

Com base nos dados da Tabela 4.7, pode-se perceber que, praticamente, quase toda FN foi adsorvida à superfície dos suportes porosos não modificados. No caso dos suportes não modificados, isento de sítios ativos para a imobilização de proteína, a imobilização ocorreu, provavelmente, pelo processo de adsorção. Apesar de ser o método mais comum utilizado para imobilizar proteínas a imobilização por adsorção é um método menos estável do que a imobilização covalente. Mas, mesmo assim, é um método conveniente, pois, pode causar menos danos na conformação da molécula adsorvida (ZHANG, *et al.* (2006))

Já para o suporte modificado com etilenodiamina o valor obtido foi acima de 100%. Para este caso dois fatores devem ser levados em consideração: a possível presença de sítios ativos para a imobilização da proteína e o fato de a superfície deste ser mais rugosa, o que culmina em maior área superficial disponível para a imobilização.

Segundo a literatura, a seqüência de peptídeos RGD pode ser covalentemente imobilizada na superfície de polímeros através dos grupos funcionais como: hidroxil, amino e carboxil (HERSEL *et al.*, 2003). Os resultados obtidos neste trabalho referentes à modificação da superfície de suportes porosos via aminólise indicam que, provavelmente, grupamentos amino foram incorporados à superfície dos suportes porosos de PHB. Como a reação de aminólise promove a quebra das ligações ésteres, além do grupo amino podem estar presentes na superfície grupos hidroxil e carboxil, o que leva a crer que, o valor encontrado para a adesão de FN à superfície do suporte poroso de PHB pode estar, diretamente, relacionado à presença destes grupamentos.

Como pode ser observado, houve formação de um filme de quitosana na superfície do suporte poroso de PHB. A quitosana, como foi dito anteriormente, possui natureza catiônica dependendo do pH e interage com espécies negativamente carregadas. Esta

propriedade da quitosana é uma das mais importantes no que tange sua utilização como biomaterial devido à possibilidade de imobilização de fatores de crescimento (KIM *et al.*, 2007).

A adsorção de proteína é dependente da molhabilidade, da química de superfície e da topografia do polímero. Estudos utilizando quitosana mostraram que um aumento na hidrofobicidade implica no aumento da adsorção de proteína quando comparado a superfície hidrofílica não modificada. Neste caso, interações hidrofóbicas governam a adsorção de proteína. Em contraste, alguns autores dizem que superfícies extremamente hidrofílicas ou hidrofóbicas mostram baixa habilidade para adsorver proteína (ATTAWJA, *et al.*, 1995). Em adição, a textura da superfície determinada pela carga, pela molhabilidade e pela topografia pode influenciar a conformação e /ou orientação da proteína. Em superfícies hidrofóbicas, as proteínas tendem a maximizar as interações com o lado da cadeia correspondente ao aminoácido hidrofóbico. Isto causa desnaturação da proteína ou uma diferente apresentação dos pontos de adesão celular (HERSEL *et al.*, 2003).

#### **4.7 Adesão de osteoblastos humanos (HOB)**

O presente trabalho limitou-se à observação dos efeitos iniciais da modificação da superfície de suportes porosos de PHB na adesão de osteoblastos humanos e, os resultados obtidos para a adesão de osteoblastos às diferentes superfícies podem ser observados na Tabela 4.8.

Diferenças significativas foram observadas na quantidade de células aderidas às diferentes superfícies dos suportes porosos de PHB. Os diferentes valores encontrados para

a adesão de osteoblastos às diferentes superfícies concordam com as evidências encontradas na literatura as quais mostram que as propriedades de superfície do material influenciam os eventos celulares iniciais. Dentre os fatores que afetam a biocompatibilidade dos materiais estão a rugosidade da superfície, a química e a energia de superfície.

**Tabela 4.8 - Associação de células HOB à superfície de suportes porosos de PHB**

Superfície dos suportes porosos	Porcentagem de células associadas (%)
Não modificada	49,3
Não modificado mais FN	83,6
Modificada com etilenodiamina por 90 min. e recoberto com FN	26,7
Modificada com quitosana por 12 h	72,5
Modificada com quitosana por 12 h e recoberta com FN	101,2

SOMBATMANKHONG, *et al.* (2007), avaliaram a biocompatibilidade “*in vitro*” entre o PHB e osteoblastos. Estudos da adesão de osteoblastos revelaram que, para um período de 4 h cerca de 62% das células ficaram aderidas à superfície de fibras de PHB produzidas por eletrofiação, e 42 % de células ficaram aderidas à superfície de filmes de PHB. Sendo assim, o resultado aqui obtido para o suporte de PHB não modificado é condizente com a literatura.

A adição de FN à superfície do suporte de PHB não modificado aumentou em 69,6 % a adesão de osteoblastos. A razão para este aumento expressivo pode estar relacionada às propriedades da FN.

A FN é um componente de matriz extracelular que age como receptor de adesão (HERSEL *et al.*, 2003). Células adesivas utilizam proteínas de matriz extracelular para aderirem e migrarem nos substratos. Desta forma, pode-se dizer que a imobilização da proteína na superfície do suporte poroso pelo método de adsorção não comprometeu a atividade da FN.

Por outro lado, os suportes modificados com etilenodiamina e recobertos com FN apresentaram um valor de adesão de osteoblastos abaixo do encontrado para o suporte não modificado. Este fato pode estar relacionado ao tipo de tratamento dado à superfície do suporte poroso, neste caso a aminólise. A adesão de células às proteínas de matriz extracelular é mediada por integrinas, as quais se ligam a um grupamento específico de uma seqüência de aminoácidos como arginina - glicina - ácido aspártico (RGD) presente em vários ligantes de matriz extracelular como a fibronectina (CUTLER & GARCÍA, 2003). Possivelmente, houve uma mudança conformacional da proteína durante a imobilização suprimindo a adesão celular, o que provocou menor exposição do domínio RGD.

Além dos vários processos que ocorrem na interface célula biomaterial, a quantidade, o tipo e a conformação da proteína adsorvida na superfície influenciam diretamente a integração célula implante. Quando em contato com um biomaterial, o comportamento da célula depende da orientação e da conformação tridimensional das biomoléculas adsorvidas na superfície do biomaterial (ALVES *et al.*, 2007).

A conformação da proteína na superfície dos suportes porosos varia de acordo com o método empregado no processo de imobilização. Segundo ZHANG *et al.* (2007), a adsorção de FN mantém o domínio RGD ativo induzindo a adesão celular. É o efeito combinado entre a composição e a conformação da proteína que produz o aumento da adesão celular. Além disso, a orientação estrutural dos domínios RGD é um fator crucial para que haja interação entre a proteína e a célula (CUTLER & GARCÍA, 2003).

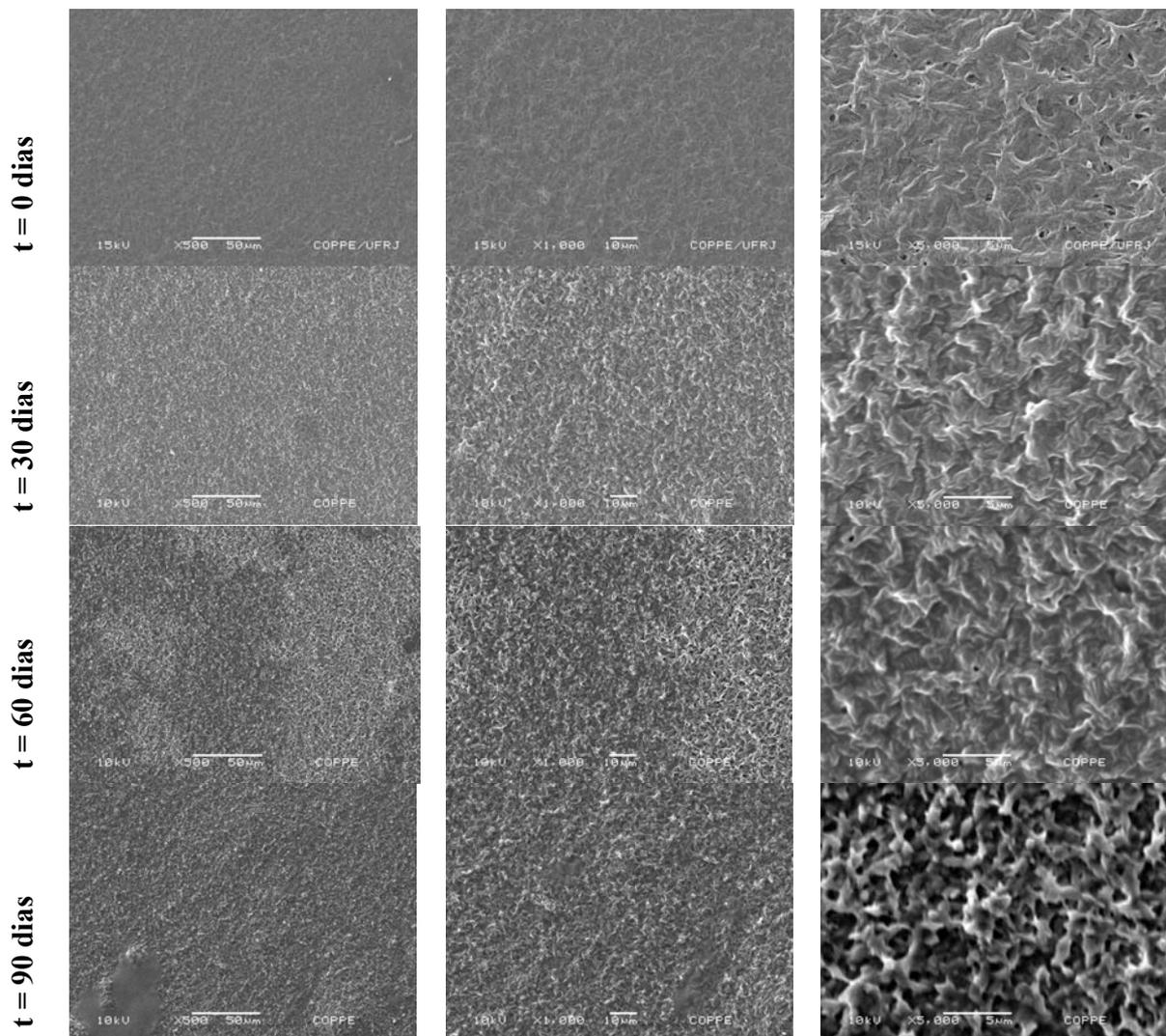
O suporte modificado com quitosana apresentou um valor de adesão de osteoblastos igual a 72,5 %, o que corresponde a um aumento de 47,05 % em relação ao suporte não modificado. Embora no presente trabalho, a modificação da superfície de suportes, porosos de PHB com quitosana tenha aumentado a adesão de osteoblastos, existem casos na literatura onde o recobrimento de biomateriais com quitosana promoveu efeito contrário. YA-WU *et al.* (2006), avaliaram o efeito do recobrimento da superfície de suportes porosos de PLGA com quitosana na adesão de osteoblastos e relatou que a presença de quitosana na superfície dos suportes porosos de PLGA diminuiu a adesão de osteoblastos. FAKHRY *et al.* (2003) mostrou que osteoblastos aderem à superfície de filmes de quitosana. Com isso, pode-se dizer que o fato da superfície do suporte poroso de PHB modificada com quitosana ter promovido um aumento na adesão de osteoblastos pode não estar somente relacionada à simples presença da quitosana, mas sim com o tipo de interação existente entre a superfície do suporte poroso de PHB e a quitosana. Desta forma, o aumento da adesão de osteoblastos, pode ser fruto do efeito sinérgico entre a superfície do suporte poroso de PHB e o polissacarídeo quitosana.

Para o suporte poroso de PHB modificado com quitosana e recoberto com FN o valor obtido para a adesão de osteoblastos aumentou 105,3 % comparado ao suporte poroso

de PHB não modificado. Como dito anteriormente, a presença de quitosana na superfície de suportes porosos de PHB por si só, favoreceu o aumento na adesão de osteoblastos. Este aumento de 105,36 % está relacionado ao efeito combinado da quitosana com a FN. Provavelmente FN tenha assumido uma conformação mais estendida na superfície modificada com quitosana de forma que o domínio RGD tenha ficado mais exposto.

#### **4.8 Estudo da degradação “*in vitro*” da superfície de suportes porosos de PHB**

A Figura 4.21 mostra imagens de microscopia eletrônica de varredura da superfície dos suportes porosos de PHB antes e depois da análise de degradação. Com base nas imagens de microscopia eletrônica de varredura pode-se dizer que a superfície do suporte poroso de PHB se degrada quando em contato com solução tampão PBS a 37°C. Quanto maior o tempo de exposição do suporte à solução mais significativa foram as modificações observadas na superfície do suporte poroso de PHB. As imagens apresentadas na Figura 4.21 sugerem a quebra das cadeias superficiais do suporte poroso de PHB em apenas 30 dias. Com 90 dias, a erosão aumenta significativamente.



*Figura 4.21 – Imagens de microscopia eletrônica de varredura das superfícies dos suportes porosos de PHB após o ensaio de degradação em tampão PBS pH 7,4 e  $T = 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ .*

#### 4.9 Bioatividade

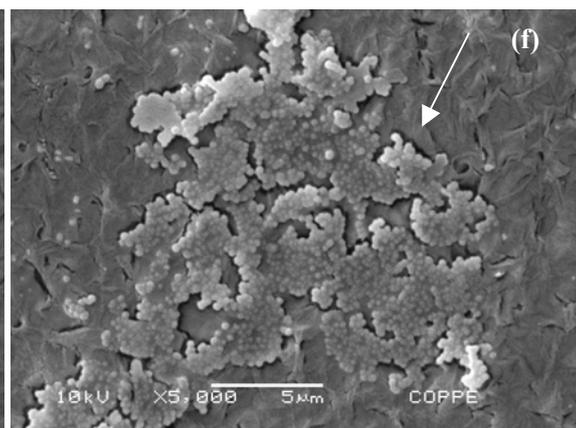
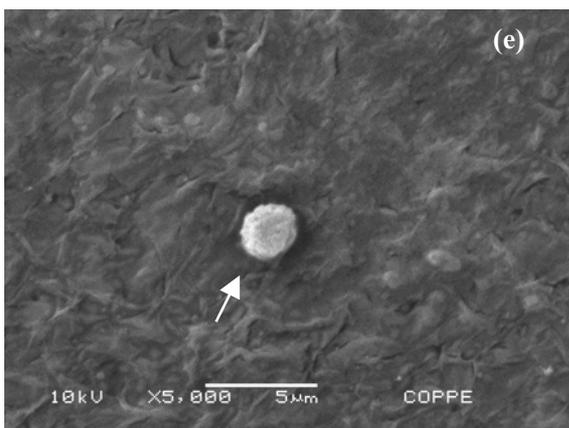
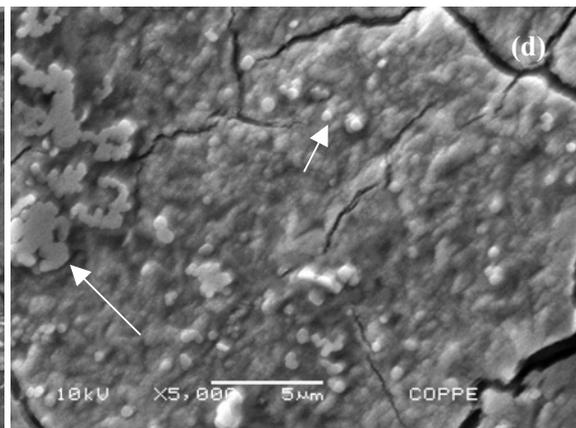
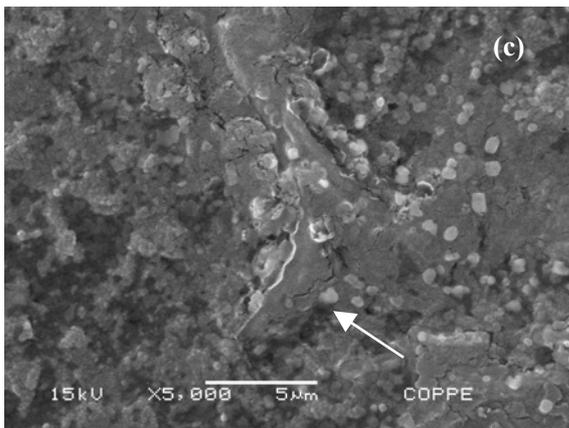
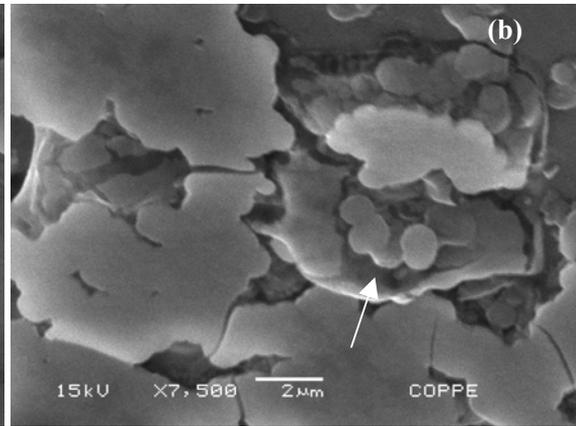
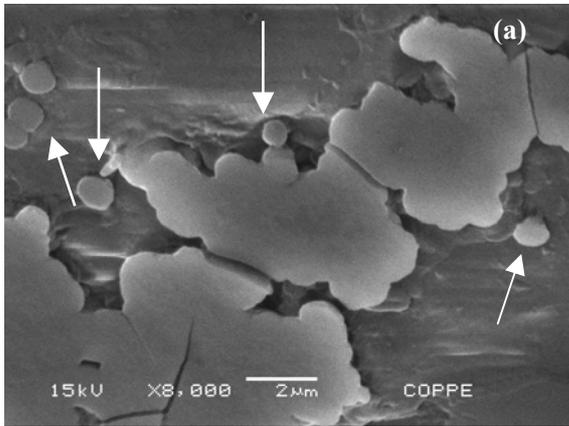
A Figura 4.22 mostra imagens da superfície de suportes não modificado, modificado com etilenodiamina e modificado com quitosana após exposição à solução SBF por 14 dias.

As regiões indicadas por setas mostram indícios de bioatividade, pois apresentam partículas com formato esférico que caracterizam a formação de fosfato de cálcio. Nas imagens mostradas na Figura 4.22 observa-se a formação de núcleos que, segundo RESENDE (2007), pode ser o início de uma nucleação heterogênea. Observa-se que há na superfície a formação de aglomerados esféricos o que é mais evidenciado na Figura 20 (f). Na superfície não modificada foi observada a formação de placas as quais apresentam bordas arredondadas sugerindo que sejam resultado da aglomeração e da deformação das esferas formadas.

Foi avaliado, por EDS, a razão molar entre o elemento Ca e o elemento P (razão Ca/P) a fim de identificar a fase de fosfato presente na superfície da amostra. A Tabela 4.9 mostra os valores da razão Ca/P obtidos através dos dados de EDS.

**Tabela 4.9** – Razão Ca/P na superfície de suportes porosos de PHB modificados ou não.

<b>Suporte poroso de PHB</b>	<b>Razão molar (Ca/P)</b>
Não modificado	0,95
Modificado com etilenodiamina – 90 min.	0,81
Modificado com quitosana – 12 horas	1,09



**Figura 4.22** – *Imagens de microscopia eletrônica de varredura da superfície de suportes porosos de PHB: não modificada (a) e (b); modificada com etilenodiamina (c) e (d); modificada com quitosana (e) e (f).*

Segundo, DOROZHKIN e EPPLE (2002), a razão Ca/P igual a 1,0 corresponde ao hidrogenofosfato de cálcio anidro e a razão Ca/P igual a 1,67 corresponde à hidroxiapatita. Com base nos valores de Ca/P encontrados e nas imagens mostradas na Figura 20, pode-se dizer que o ensaio de bioatividade não foi conclusivo.

# CAPÍTULO V

---

## CONCLUSÕES

O presente trabalho objetivou a construção de suportes porosos de PHB capazes de induzir a adesão de osteoblastos visando, futuramente, a construção de um novo tecido ósseo. As superfícies dos suportes porosos de PHB foram modificadas com intuito de fornecer subsídios para melhorar a adesão celular. O material aqui desenvolvido destina-se à aplicação em engenharia óssea através da combinação de células osteoblásticas humanas e matrizes de PHB com superfícies modificadas ou não.

No presente trabalho, foi avaliado o efeito da modificação de superfície de suportes porosos com etilenodiamina ou quitosana na imobilização de FN. Estudos “*in vitro*” foram conduzidos para avaliar a adesão de osteoblastos às diferentes superfícies.

O tratamento dos suportes porosos com solução de etilenodiamina modificou a superfície dos suportes porosos de PHB morfologicamente e topograficamente como pôde ser observado nas imagens de microscopia eletrônica de varredura, e de força atômica. De acordo com as análises de EDS a composição química da superfície foi alterada e nitrogênio foi incorporado à superfície. Com a aminólise a rugosidade da superfície passou de 135,2 nm para 173,4 nm. A aminólise promoveu uma pequena redução do ângulo de contato dos suportes aminolisados por 45, 90, e 120 minutos. Contudo, após 90 minutos, o ângulo de contato aumentou. Isto, provavelmente, em decorrência do aumento de rugosidade da superfície.

A modificação de superfície utilizando quitosana alterou a composição química e a morfologia da superfície. Imagens de contraste de fase obtidas por microscopia de força atômica revelaram que o recobrimento da superfície do suporte por quitosana não foi uniforme. A deposição de quitosana aumentou ligeiramente o ângulo de contato e diminuiu a rugosidade da superfície que passou de 135,2 nm para 87 nm. Ensaios “*in vitro*” mostraram que modificação com quitosana aumentou em 47,05 % a adesão de osteoblastos humanos.

Fibronectina foi imobilizada nas superfícies modificadas ou não. Foi observado que o tipo de tratamento dado à superfície dos suportes porosos de PHB influenciou na forma como a proteína foi imobilizada. Prova disso são os diferentes valores obtidos para a adesão de osteoblastos às superfícies dos suportes.

Estudos “*in vitro*” avaliando o efeito da presença de FN na adesão de osteoblastos em relação ao suporte não modificado foram conduzidos. A presença de FN na superfície não modificada aumentou em 69,6% a adesão de osteoblastos. Para os suportes modificados com quitosana e recobertos com FN o aumento da adesão foi de 105,3 %. Já para os suportes modificados com etilenodiamina e recobertos com FN foi observada uma redução da adesão de osteoblastos, donde se conclui que a conformação da proteína foi alterada e em consequência disto a adesão foi suprimida.

De forma geral, o objetivo do presente trabalho foi alcançado. Dentre os dois tratamentos utilizados para modificar a superfície a fim de imobilizar FN, o que empregou quitosana foi o mais adequado. Embora os resultados da combinação da quitosana com FN tenham sido expressivos, algumas alterações no processo podem ser avaliadas. Dentre elas destacam-se: a utilização de quitosana com diferentes graus de desacetilação, alterações na concentração da solução de quitosana, quantificação da incorporação de quitosana à superfície do suporte, variações de pH entre outras. O tratamento com etilenodiamina

mostrou não ser adequado para a imobilização de FN uma vez que reduz a atividade da proteína no que tange a adesão de osteoblastos.

Estudos mais detalhados para avaliar a bioatividade das superfícies modificadas ou não devem ser realizados. Além disso, análises termogravimétricas e de FTIR devem ser realizadas para complementar o estudo da biodegradabilidade do material. Ensaio “*in vitro*” mais detalhados devem ser conduzidos para acompanhar a interação entre osteoblastos e a superfície dos suportes.

# CAPÍTULO VI

---

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, C.M., YANG, Y., CARNES, D.L., *et al.*, 2007. “Modulating bone cells response onto starch-based biomaterials by surface plasma treatment and protein adsorption”, *Biomaterials* v.28, pp. 307–315
- ANSELME, K., 2000, “Osteoblast adhesion on biomaterials”, *Biomaterial*, v. 21, pp. 667 – 681.
- ARKIN, A. H., HAZER, B., 2002. “Chemical Modification of Chlorinated Microbial Polyesters”, *Biomacromolecules*, v. 3, pp. 1327-1335.
- ATTAWJA, M.A., HERBERT, K.M., LAURENCINE, C.T., 1995. “Osteoblast like cells adherence and migration through 3-dimensional porous polymer matrices”, *Biochemical an Biophysical Research Communication*, v. 213, pp. 639-644.
- BARBANTI, S. H., ZAVAGLIA, C.A., 2005 “Polímeros Biorreabsorvíveis em engenharia de Tecidos Polímeros Bioreabsorvíveis na Engenharia de Tecidos”, *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v. 15, pp. 13-21.
- BARBUCCI, R., MAGNANI, A., CHIUMIENTO, A., *et al.*, 2005. “Fibroblast Cell Behavior on Bound and Adsorbed Fibronectin onto Hyaluronan and Sulfated Hyaluronan Substrates”, *Biomacromolecules* v. 6, pp. 638-645.
- BHATTARAI, N., EDMONDSON, D., VEISEH, O., *et al.*, 2005. “Electrospun chitosan-based nano.bers and their cellular compatibility”, *Biomaterials* v.26, pp. 6176–6184.
- BLUNK, T., GÖPFERICH, A., TESSMAR, J., 2003. “Special issue Biomimetic Polymers” *Biomaterials*, v. 24, pp. 4335.
- BRADFORD, M.M., 1976. “Arapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding

- Analytical Biochemistry*, Volume 72, Issues 1-2, 7 May 1976, Pages 248-254  
v. 72, 248.
- BRANDL, H., BACHOFEN, R., J. MAYER, E. *et al.*; 1995 “Degradation and applications of polyhydroxyalkanoates”, *Canadian Journal of Microbiology* v 41, pp.,143-153.
- BUENO, W.A., 1989, *Manual de Espectroscopia Vibracional*. São Paulo, Brasil, McGraw-Hill.
- BUMGARDNER JD, WISER R, GERARD PD, *et al.*, 2003. “Chitosan: potential use as a bioactive coating for orthopaedic and craniofacial/dental implants”. *Journal of Biomaterial Science Polymer*, v.14, pp. 423 – 438.
- CAI, K., RECHTENBACH, A., HAO, J., *et al.*, 2005. “Polysaccharide-protein surface modification of titanium via a layer-by-layer technique: Characterization and cell behaviour aspects”, *Biomaterials* v. 26, pp. 5960–5971.
- CAI, K., YAO, K., YANG, Z., 2007. “Histological study of surface modified three dimensional poly (D, L-lactic acid) scaffolds with chitosan in vivo”, *Journal of materials science. Materials in medicine* , v. 18, pp. 2017–2024.
- CAIA, K., RECHTENBACH, A., HAOA, J. *et al.*, 2005. “Polysaccharide-protein surface modification of titanium via a layer-by-layer technique: Characterization and cell behavior aspects” *Biomaterials* v. 26, pp. 5960–5971.
- CANCEDDA R., MASTROGIACOMO M., BIANCHI, G., *et al.*, 2003. Bone marrow stromal cells and their use in regenerating bone”. *Novartis Foundation Symposium* v.249:, pp. 133–143.
- CANCEDDA. R., GIANNONIC, P., MASTROGIACOMOA, M., 2007. “A tissue engineering approach to bone repair in large animal models and” *Biomaterials* v. 28, pp. 4240–4250.
- CARBAJAL, M.L., SMOLKO, E.E., GRASSELLI, M., 2003. “Oriented immobilization of proteins on grafted porous polymers”, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research*, v. B 208, pp. 416-423.

- CARVALHO, A.C. *Aspectos tecnológicos e mercadológicos da reciclagem de plásticos descartados de lanchonetes*. Dissertação de mestrado, (IMA/UFRJ), Rio de Janeiro, Brasil, 1997
- CASTELLAN, G., “Fundamentos de Físico-Química”, 1ª Edição, Livros Técnicos Editora S. A., Rio de Janeiro, 1986.
- COSTA E SILVA FILHO, F, MENEZES GC, 2004. “Osteoblasts attachment and adhesion: how bone cells fit fibronectin-coated surfaces”, *Materials Science & Engineering. A, Structural Materials: properties, microstructure and processing*, v. 24, pp. 637-641.
- CRUZ, A. S., 1987. “Culturas celulares na detecção da toxicidade de materiais médico-hospitalares e outros que entrem em contato com o ser humano” *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, v. 47 pp. 51-57
- CUTLER SM, GARCIA AJ, 2003. “Engineering cell adhesive surfaces that direct integrin alpha5beta1 binding using a recombinant fragment of fibronectin”. *Biomaterials* v.24, pp. 1759–1770.
- DENGA, Y., ZHAO, K., ZHANG, X. *et al.*, 2002. “Study on the three-dimensional proliferation of rabbit articular cartilage-derived chondrocytes polyhydroxyalkanoate scaffolds” *Biomaterials* v.23, pp. 4049–4056.
- DOREMUS, R. H., 1992. “Review Bioceramics”, *Journal of Material Science*, v. 27, pp. 285-297.
- DOROZHKIN, S.V., EPPLE, M., 2002, "Biological and medical significance of calcium phosphates", *Angewandte Chemie-International Edition*, v. 41, n. 17, pp. 3130-3146.
- EL-HADI A.; SCHNABEL, R; STRAUBE E., MÜLLER G; et al. “Correlation between degree of crystallinity, morphology, glass temperature, mechanical properties and biodegradation of poly (3-hydroxyalkanoate) PHAs and their blends” *Polymer Testing* v.21 (2002), pp. 665–674
- EUGENE K, LEE YL 2003. “Implantable applications of chitin and chitosan” *Biomaterials* v.24, pp. 2339–2349.

- FAKHRY, A., SCHNEIDER, G.B. ZAHARIAS, R. *et al.*, 2004. “Chitosan supports the initial attachment and spreading of osteoblasts preferentially over fibroblasts” *Biomaterials* v.25, pp.2075–2079.
- FILIPCZAK K., JANIK, I., KOZICKI M. *et al.*, 2005. “Porous polymeric scaffolds for bone regeneration” *E-Polymers*, v.20, art 11.
- FOUST A.S., WENZEL, L.A., CLUMP C.W., MAUS, L., ANDERSEN, L.B., *Princípio das Operações Unitárias*. 2 ed. Rio de Janeiro, Livros Técnicos e Científicos Editora, 1982.
- FUCHS, J.R., NASSERI, B.A., VACANTI, J.P, 2001. “Tissue Engineering: a 21<sup>st</sup> century solution to surgical reconstruction”, *Ann. Thoracic Surgery* v.72, pp. 577-591.
- GEOFFREY, K.H., PANG, K.Z., BABA, K., *et al*, 2000. “Topographic and phase-contrast imaging in atomic force microscopy” *Ultramicroscopy*, v. 81, pp. 35-40.
- GRINNELL, F., BILLIE, R., LANG, R. *et al.*, 1982. “Binding of plasma fibronectin to the surfaces of BHK cells in suspension at 4°C” *Experimental Cell Research*, v. 142, pp.499-504
- GROSS, R.A., DEMELLO, C., LENZ, R.W., 1989. “Biosynthesis and characterization of poly (b-hydroxyalkanoates) produced by *Pseudomonas oleovorans*”, *Macromolecules*, v. 22, pp. 1106-1115.
- HAYASHI; T., 1994. “Biodegradable polymers for biomedical uses”, *Progress in Polymer Science*, v. 19, pp.663-702.
- HELMUS, M.N., TWEDEN; K., 1995. “Materials selection” in *Encyclopedia Handbook of Biomaterials and Bioengineering*, v 2, Part A, pp. 1429-1463.
- HERSEL, U., DAHMEN, C., KESSLER,H., 2003. “RGD modified polymers: biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond”, *Biomaterial*, v.24, pp. 4385-4415.
- HO, M-G.WANG, D-M., HOU, L-T., *et al.*,2006. “Preparation of cell-specific membranes for bone regeneration by peptide grafting”, *Desalination* v.199, pp. 144–146.
- HOLLÄNDER, A., THOME, J., KEUSGEN, M., 2004. “Polymer surface chemistry for biologically active materials”, *Applied Surface Science* v. 235 pp. 145–150

- HOMANDBERG G.A., ERICKSON J.W., 1986. "Model of fibronectin tertiary structure based on studies of interactions between fragments", *Biochemistry* v. 25, pp. 6917-6925
- HONG SG, CHEN WM, 2006. "The attenuated total reflection infrared analysis of surface crystallinity of polyhydroxyalkanoates" *E-Polymers* Art. n° 024, pp. 1-17.
- HUMPHRIS, A.D.L., MILLES, M.J., HOBBS, J.K., 2005. "A mechanical microscope: High-speed atomic force microscopy", *Applied Physics Letters* v. 86, 34106.
- HUTMACHER, D.W, 2000. "Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage", *Biomaterials*, v. 21, n 24, pp. 2529-2543.
- INOUE Y, & YOSHI, 1992. "Structure and physical properties of bacterially synthesized polyesters", *Progress in Polymer Science*, v.17 pp. 571-610
- ITO, Y., 1998. "Tissue engineering by immobilized growth factors" *Materials Science and Engineering* v.6 ,pp. 267-274.
- ITO, Y., JI Z. and YUKIO I. 1997, "Enhancement of cell growth on a porous membrane co-immobilized with cell-growth and cell adhesion factors" *Biomaterials* v. 18, pp.197-202.
- JANSEN, J.P, SLADEK E;J., BAHAR H. *et al.*2005. "Hydrophobicity as a design criterion for polymer scaffolds in bone tissue engineering", *Biomaterials*, v.26, pp. 4423–4431.
- JOHNSON K.J., SAGE H., BRISCOE G., ERICKSON H.P., 1999. "The compact conformation of fibronectin is determined by intramolecular ionic interactions", *Journal of Biological Chemistry* v. 274 pp. 15473-15479.
- JUSTI, K.C., LARANJEIRA, M.C.M., NEVES A., *et al.*, 2004. "Chitosan functionalized with 2[-bis-(pyridylmethyl) aminomethyl]4-methyl-6-formyl-phenol: equilibrium and kinetics of copper (II) adsorption", *Polymer* v. 45, pp. 6285–6290.
- KARAGEORGIU, V., KAPLAN, D., 2005. "Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis", *Biomaterials*, v. 26, pp. 5474-5491.

- KARLSSON, S., ALBERSTSSON, A-C, 1998. "Abiotic and biotic degradation of aliphatic polyesters from "petro" versus green" resources", *Macromolecules Symposia*, v. 127, pp. 219-225.
- KHARLAMPIEV, E. & SUKHISHVILI A.S., 2003. "Ionization and pH Stability of Multilayers Formed by Self-Assembly of Weak Polyelectrolytes" *Langmuir* v. 19, pp. 1235-1243.
- KHNOR E, LIM L, 2003. "Implantated applications of chitin and chitosan.Biomaterials" v. 24, pp.2339-49.
- KIM, I., SEO, S.J., MOON, H.S., ET AL, 2007. "Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications", *Biotechnology Advances*, v.xx , pp. xxx-xxx
- KOKUBO, T., KUSHITANI, H., . SAKKA, S *et al.* 1990. "Solutions able to reproduce in vivo surface-structure changes in bioactive glass-ceramic A-W", *J. BIOMED. MATER. RES.*, 24, 721-734 .
- LANGER, R., TIRREL, D.A., 2004. "Designing materials for biology and medicine", *Nature*, v.428, pp. 487-492.
- LEE JY, NAM SH, IM SY, *et al.*, 2002. " Enhanced bone formation by controlled growth factor delivery from chitosan-based biomaterials". *J Control Release* v.78, pp.187-97.
- LIU, Y., HE, T., GAO, C., 2005. "Surface modification of poly(ethylene terephthalate, via hydrolysis and layer-by-layer assembly of chitosan and chondroitin sulfate to construct cytocompatible layer for human endothelial cells" *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* v.46, pp. 117-126.

- LORCAN T. A., TOSETTO M., MILLER I. S., *et al.* 2006. "Surface-induced changes in protein adsorption and implications for cellular phenotypic responses to surface interactions", *Biomaterials* v. 27, pp.3096–3108
- MA, P.X., 2004. "Scaffolds for Tissue Fabrication", *Materials Today*, v. 07, pp. 30-40
- MA, Z. *et al.*, 2002. "Effects of surface morphology on the biocompatibility of polyhydroxyalkanoates", *European Polymer Journal* v. 38, pp.2279–2284.
- MADIHALLY SV, MATTHEW HWT. *et al.*, 1999. "Porous chitosan scaffolds for tissue Engineering", *Biomaterials* v. 20 pp.1133–42.
- MADISON L. L., MADISON G. W. 1999, "Metabolic engineering of poly(3-hydroxybutyrate) and its copolymer) from DNA to plastic" *Microbiology and Molecular biology Reviews*, v. 63, pp. 21-53
- MEIJER, G.J., BRUIJN, J.D., KOOLE, R., *et al.*, 2007. "Cell-Based Bone Tissue Engineering", *Plos Medicine*, v. 4, pp. 260-263.
- MEYER, A.A., SCHRODER, K., FINKE B., *et.al.*, 2003. "Current trends in biomaterial surface functionalization - nitrogen-containing plasma assisted processes with enhanced selectivity" *Symposium on Plasma Surface Engineering, Regensburg, Allemagne* v.71, pp.391-406.
- MIKOS, A.G., SARAkinos, G., LEITE, S.M., *et al.*, 1993. "Laminated three-dimensional biodegradable foams for use in tissue engineering", *Biomaterials*, v. 14, pp. 323-330.
- MIKOS, A.G., THORSEN, A.J., CZERWONKA, L.A., *et al.*, 1994. "Preparation and characterization of poly(L-lactic acid) foams", *Polymer*, v. 35, pp. 1068-1077.

- NEAMNARK, A., SANCHAVANAKIT, N., PAVASANT, P., *et al.*, 2007. “In vitro biocompatibility evaluations of hexanoyl chitosan film”, *Carbohydrate Polymers*, v.68, pp. 166-172.
- NGUYEN, Q.T, GLINEL, K., PONTIÉ, M, *et al.*, 2004. “Immobilization of bio-macromolecules onto membranes via an adsorbed nanolayer an insight into the mechanism” *Journal of Membrane Science* v.232 pp. 123–132.
- NISHIKAWA H, UENO A, NISHIKAWA S, *et al.*, 2000. “Sulfated glycosaminoglycan synthesis and its regulation by transforming growth factor-beta in rat clonal dental pulp cells”. *J Endod*, v. 26, pp. 169-171.
- OKAMOTO Y, MINAMI S, MATSUHASHI A, *et al.*, 1993. “Polymeric N acetyl-D-glucosamine (Chitin) induces histionic activation in dogs. *J Vet Med Sci* v.; 55 pp. 739–42.
- ORÉFICE, R.L., PEREIRA, M. & MANSUR, H.S. *Biomateriais - Fundamentos e Aplicações*, 2005, 1 ed, Rio de Janeiro, Editora Cultura Médica.
- ÖSTERLUND E., 1988. “The secondary structure of human plasma fibronectin: conformational changes induced by acidic pH and elevated temperatures; a circular dichroic study” *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 955, pp. 330-336.
- QUANG, T. N., PING , TUYEN, N., PIERRE R., 2003. “Simple method for immobilization of bio-macromolecules onto membranes of different types” *Journal of Membrane Science*. v.213, pp.85–95.
- REDDY, C.S.K., RASHMI, R. GHAI, KALIA V.C., 2003. “Polyhydroxyalkanoates: an overview”, *Bioresource Technology* v.87, pp.137–146.

- RENSTAD, K R., ALBERTSSON, A.C, *et al*, 1997.; “Influence of processing parameters on the molecular weight and mechanical properties of poly(3-hydroxybutyrate/3-hydroxyvalerate) copolymers”, *Polymer Degradation and Stability*, v. 57, pp. 331-338.
- RESENDE, C.X., Estudo Teórico- Experimental de duas soluções para testes de bioatividade e revestimento de metais, COPPE-PEMM/UFRJ, Rio de Janeiro, Brasil, 2007.
- RINAUDO, QUARTO R., MASTROGIACOMO M., CANCEDDA, R., *et al.*, 2001.“Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells”. *New England Journal of Medicine* v. 344, pp. 385–386.
- ROUXHET L, DUHOUX F, BORECKY O, *et al.*, 1998. “Adsorption of albumin, collagen, and fibronectin on the surface of poly(hydroxybutyrate-hydroxyvalerate) (PHB/HV) and of poly(epsilon-caprolactone) (PCL) films modified by an alkaline hydrolysis and of poly(ethylene terephthalate) (PET) track-etched membranes” *Journal of Biomaterial Science Polymer*, v. 12 pp. 1279-1304.
- ROUXHET, L., LEGRAS, R., SCNEIDER, Y.J., 1998. “Interactions between a biodegradable polymer, poly(hydroxybutyrate-hydroxyvalerate), proteins and macrophages”, *Macromolecular Symposia*, v. 130, pp. 347-366.
- S’ANCHEZ-SALCEDO,S., NIETO,A., VALLET-REGY, M., 2007. “Hydroxyapatite/tricalcium phosphate/agarose macroporous scaffolds for bone tissue engineering” *Chemical Engineering Journal* v. xxx, pp. xxx–xxx

- SADER, M. S., *Preparação e Caracterização de Estruturas Porosas do Poliéster Biodegradável Poli(3-hidroxibutirato) para aplicações em Engenharia de Tecidos*. dissertação de mestrado, (IMA/UFRJ), Rio de Janeiro, Brasil, 2002
- SHIN, H., 2007. “Fabrication methods of an engineered microenvironment for analysis of cell–biomaterial interactions”, *Biomaterials* v.28, pp.126–133.
- SHIN, H., JO S., MIKOS A.G., 2003. “Biomimetic materials for tissue engineering”, *Biomaterials*, v. 24, pp. 4353–4364.
- SHIN, H., JO, S., MIKOS, A.G., 2003. “Biomimetic materials for tissue engineering”, *Biomaterials* v.24, pp. 4353–4364.
- SILVERSTEIN R. M., BASSLER G. C. E MORRIL T. C., 1981, *Spectrometric Identification of Organic Compounds*, 4 ed. New York, John Wiley and Sons.
- SINGLA AK, CHAWLA M., 2001. “Chitosan: some pharmaceutical and biological aspects—an update”, *Pharm Pharmacol* v. 53, pp.1047–1067.
- SOLOMONS, T. W.G., GRAIG, F. B., *Química Orgânica II*, 2000, 7ed. Rio de Janeiro, Livros Técnicos e Científicos AS.
- SOMBATMANKHONG, K., SANCHAVANAKIT, N., PAVASANT, P. *et al.*, 2007. “Bone scaffolds from elctrospun fiber mats of poly(3-hydroxybuyrate-co-3-hydroxyvalerate) and their blend”, *Polymer*, v. 48, pp.1419-1427.
- STEFFENS, G.C., NOTHDURFT, L. G., BUSE, H. T. *et al.*, 2002 “High density binding of proteins and peptides to poly(d,l-lactide) grafted with polyacrylic acid” *Biomaterials* v.23, pp. 3523–3531.

- SUDESH, K.H., DOI, A.Y., 2000 “Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters” *Progress. Polymer Science*.v.25, pp. 1503-1555.
- TAGUCHI, S., NAKAMURA, H., KICHISE T., 2003. “Production of polyhydroxyalkanoate (PHA) from renewable carbon sources in recombinant *Ralstonia eutropha* using mutants of original PHA synthase” *Biochemical Engineering Journal* v.16 pp.107–113
- TANIGAWA T, TANAKA Y, SASHIWA H, *et al.*, 1992. “Various biological effects of chitin derivatives. In: Brine CJ, Sandford PA, Zikakis JP, editors. *Advances in CHITIN AND CHITOSAN. ELSEVIER V.*, P. 206–15.
- THIRÉ, R. M. S.M., MEIGA, T. O., DICK, S., *et al.*,2007. “Functionalization of Biodegradable Polyester for Tissue Engineering Applications”, *Macromolecular Symposia*, v. 258, n. 1, pp. 38-44.
- TOKURA S, UENO K, MIYAZAKI S, *et al*, 1997. Nishi N. Molecular weight dependent antimicrobial activity by chitosan. *Macromol Symp* v.120, pp. 1–9.
- VAN OSS C.J.,1986. “The role of van der Waals forces and hydrogen bonds in hydrophobic interactions’ between biopolymers and low energy surfaces”. *J CollInterface Sci* v.111, pp. 378-390.
- VANIN M., SANTANA ,C.C., 2004. “Estudo da Degradação “*In Vitro*” de Blendas de Poli( $\alpha$ -Hidroxibutirato) (PHB) / Poli(L-Ácido Lático) (PLLA) na Forma de Filmes” *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v. 14, pp. 187-193.

- WIDMER, M.S., GUPTA, P.K., LU, L., *et al.* 1998. "Manufacture of porous biodegradable polymer conduits by an extrusion process for guided tissue regeneration" *Biomaterial*, v.19, pp.1945-1955.
- WILLIAMS E.C., JANMEY P.A., FERRY J.D., MOSHER D.F. 1982. "Conformational states of fibronectin: effects of pH, ionic strength and collagen binding" *Journal of Biological Chemistry* v.257, pp. 14973-14978.
- WITTMER, C.R., PHELP, J.A., SALTZMAN, W.M, *ET AL.* 2007."Fibronectin terminated multilayer films: Protein adsorption and cell attachment studies", *Biomaterials* v.28, pp. 851–860.
- YANG, X., ZHAO, K., CHEN, G.-Q., 2002. "Effect of surface treatment on the biocompatibility of microbial polyhydroxyalkanoates" *Biomaterials* v. 23, pp.1391–1397
- YA-WU, W., YANG, F. QIONG, W. *et al.*, 2005. "Effect of composition of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) on growth of fibroblast and osteoblast" *Biomaterials* v.26, pp., 755–761
- YU, D.G., JOU, C.H., LIN, W.C., *et al.*, 2007. "Surface modification of poly(tetramethylene adipate-co-terephthalate) membrane via layer-by-layer assembly of chitosan and dextran sulfate polyelectrolyte multiplayer", *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* v. 54, pp. 222–229.
- YU, J., PLACKETT, D., CHEN, X.L.X., 2005. "Kinetics and mechanism of the monomeric products from abiotic hydrolysis of poly[(R)-3-hydroxybutyrate] under

- acidic and alkaline conditions, *Polymer Degradation and Stability*, v.89, pp.289 – 299.
- ZHANG, X., HUA, H., HEN, X., YANG, Q., 2007. “In vitro degradation and biocompatibility of poly(L-lactic acid)/chitosan fiber composites”, *Polymer*, v. 48, pp. 1005-1011.
- ZHANG, Y., CHAI, C., JIANG, X.S., *et al.*, 2006, “Fibronectin immobilized by covalent conjugation or physical adsorption shows different bioactivity on aminated-PET” *Materials Science and Engineering*, v. C. 27, pp.213–219.
- ZHAO, K., DENG, Y., CHEN, J.C. *et al.*, 2003. “Polyhydroxyalkanoate (PHA) scaffolds with good mechanical properties and biocompatibility” *Biomaterials* v.24, pp.1041–1045.
- ZHU, Y., GAO, C., HE, T. *et al*, 2004. “Endothelium regeneration on luminal surface of polyurethane vascular scaffold modified with diamine and covalently grafted with gelatin”, *Biomaterials* v.25, pp. 423–430.
- ZHU, Y., GAO, C., HE, T., *et al.*, 2004. “Endothelium regeneration on luminal surface of polyurethane vascular scaffold modified with diamine and covalently grafted with gelatin”, *Biomaterial*, v. 24, pp. 423 – 430.
- ZHU, Y., LEONG, M. F. ONG, W.F., *et al.*, 2007. “Esophageal epithelium regeneration on fibronectin grafted poly(L-lactide-co-caprolactone) (PLLC) nanofiber scaffold”, *Biomaterials* v. 28 pp. 861–868.
- ZHU, Y.; GAO, C., LIU, X., SHEN, J, 2002. “Surface Modification of Polycaprolactone Membrane via Aminolysis and Biomacromolecule

Immobilization for Promoting Cytocompatibility of Human Endothelial Cells”,  
*Biomacromolecules*, v. 3, pp.1312-1319.

ZHU. A., CHEN, T., 2006. “Blood compatibility of surface-engineered poly(ethylene terephthalate) via o-carboxymethylchitosan”, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* v. 50, pp. 120–125.